

## INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)  
07 January 2000 (07.01.00)

International application No.  
PCT/EP99/03292

Applicant's or agent's file reference  
C 1540 PCT

International filing date (day/month/year)  
12 May 1999 (12.05.99)

Priority date (day/month/year)  
13 May 1998 (13.05.98)

## Applicant

NEUHAUS, Ekkehard et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
26 November 1999 (26.11.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

C. Cupello

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

VOSSIUS & PARTNER  
Siebertstrasse 4  
D-81675 München  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 27 November 2000 (27.11.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference C 1540 PCT	
International application No. PCT/EP99/03292	International filing date (day/month/year) 12 May 1999 (12.05.99)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN D-Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

The above-mentioned applicant should now be deleted from the records as an applicant for all designated States except US.

## 4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Ingrid Aulich  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C07K14/415 A01H5/00 C12N15/29

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NEUHAUS H E ET AL.: "Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of <i>Arabidopsis thaliana</i> L." ✓ PLANT JOURNAL, Bd. 11, Nr. 1, 1997, Seiten 73-82, XP002126932 ISSN: 0960-7412 in der Anmeldung erwähnt siehe besonders Seite 7 Absatz 2 das ganze Dokument	1-16
A	WO 94 10320 A (MOGEN INT ; SIJMONS PETER ✓ CHRISTIAAN (NL); GODDIJN OSCAR JOHANNES M) 11. Mai 1994 (1994-05-11) das ganze Dokument	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und die Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

X\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Januar 2000

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

24/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MÖHLMANN T ET AL.: "Occurence of two plastidic ATP/ADP transporters in Arabidopsis thaliana L" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, ✓ Bd. 252, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 353-359, XP000865628 ✓ ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument ---	
A	EMMERMANN M ET AL.: "The ADP/ATP translocator from potato has a long amino-terminal extension" ✓ CURRENT BIOLOGY, Bd. 20, Nr. 5, November 1991 (1991-11), Seiten 405-410, XP000863257 ✓ das ganze Dokument -----	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen:

EP 99/03292

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9410320 A	11-05-1994	AU 5420594 A	24-05-1994
		CA 2148451 A	11-05-1994
		EP 0666922 A	16-08-1995
-----			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

FILE COPY

Plant Polymer  
carbohydrates 11/93

NBC

lack of  
phenotypic  $\Delta$

pp 33-39

XP 002014045

EXRV

# STARCH SYNTHESIS IN TRANSGENIC PLANTS

Starch synthesis

L. Willmitzer, J. Koßmann, B. Müller-Röber and U. Sonnewald

Signal sequence

INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH,  
IHNESTRASSE 63, W-1000 BERLIN 33, GERMANY

Antisense  
RNA

P.D. 01/07/1993
p. 33-39 = 7

## 1 INTRODUCTION

Plant biotechnology has bloomed within the last decade. Major breakthroughs are the development of methods allowing the transfer of isolated and well-defined genes into plant cells, the regeneration of intact and fertile transgenic plants, the identification of regulatory structures within plant genes controlling the expression of these genes on the transcriptional level as well as the identification of structures in proteins directing them to certain subcellular organelles. In addition the possibility of inhibiting the expression of endogenous genes via introducing genes coding an anti-sense RNA has become a routine method.

It is obvious that this methodology can not only be used for a better understanding of the plant but also to improve plants in traits wanted by mankind. Thus massive efforts are presently undertaken aiming at modifying plants with respect to their biosynthetic capacity trying to produce new or modified compounds in higher plants. This idea of using plants as a bioreactor is not only a challenging scientific question but also might create a new market for the farmer which at least in Western Europe and North America is politically desirable.

In the first part of this contribution we will briefly review the recently developed methodology allowing transgenic plants to be created. In the second part we will describe first applications of this technique with respect to modifying starch quality and quantity in transgenic plants.

## 2 TECHNIQUES DEVELOPED FOR THE CREATION OF TRANSGENIC PLANTS CHANGED IN A CERTAIN PARAMETER

### Transfer of DNA into Plant Cells and Regeneration of Intact and Fertile Plants

Transfer of isolated DNA into plant cells is now a routine procedure which works for many different plants including crop species. Several methods exist to transfer DNA into cells. The ability of the gram-negative soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens* to introduce genetic material into the nucleus of at least most of the dicotyledonous plants (cf. 1 for a review) is still the preferred method in the case of trans-

112  
br  
r. 38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

less protoplasts of plants by naked DNA present in the medium in the presence of either polyethylene glycol or calcium (cf. 2 for a review). Numerous other possibilities have been described for the delivery of DNA into cells including microinjection<sup>3</sup>, liposome fusion<sup>4</sup> or the biolistics approach<sup>5</sup>. Whereas it is therefore no major problem to obtain single cells or undifferentiated cell clumps genetically being altered due to gene transfer, it turns out to be a much more difficult problem to obtain intact and fertile transgenic plants.

Thus it is probably fair to say that at the present stage the number of plant species and genotypes accessible to transformation is no longer limited by the methodology to transfer single isolated genes into plant cells but rather by the ability/inability to regenerate intact and fertile plants out of genetically transformed plant cells. The different strategies to overcome this problem go along with using different vector systems/delivery systems for transferring DNA into plant cells and are connected to the plant species to be transformed resp. its tissue culture ability.

### Controlled Expression of Foreign Genes in Transgenic Plants

One important aspect of plant gene technology and the production of transgenic plants is the controlled and predetermined expression of foreign genes. A special desire might e.g. be to produce a certain enzyme/protein only during certain developmental phases of a plant such as embryogenesis or germination, in certain organs e.g. seeds, leaves, tubers, roots or flowers, in certain tissues e.g. epidermis, phloem, tapetum, mesophyll cells, meristematic tissues or only during certain environmental conditions e.g. in the light, in the dark, upon pathogen attack, upon wounding, under drought conditions etc.

Due to the fact that the identification and characterization of plant genes has been one of the major research areas in Plant Molecular Biology during the last couple of years, a clear concept has developed allowing the construction of chimeric genes expressing the coding sequence in a predetermined manner.

Generally it has been observed that sequences located 5' to the RNA-coding sequence of the respective gene contain many if not all of the signals necessary to ensure the correct expression. This has been proven by taking the 5'-upstream region of plant genes, fusing it to a marker gene encoding an easily scorable product and, after addition of a poly-adenylation signal, transfer the chimeric gene back to the plant using either one of the above mentioned techniques. A list of typical representatives of various types of promoters identified in different plants is given<sup>6</sup>.

Despite the fact that for many promoters it is proven that they retain their specificity of expression in heterologous plants, the level of expression of one and the same gene present in independent transformants as a rule varies widely<sup>7</sup>. This phenomenon, which is not specific for plants but has been observed in other transgenic eucaryotes too, is probably due to sequences neighbouring the transferred gene after its integration. Surprisingly, although these neighbouring sequences strongly influence the quantitative level of expression of the transferred gene, as a rule, they do not at all influence the qualitative expression pattern.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Targetting of Foreign Proteins into Certain Subcellular Compartments

A characteristic feature of a eucaryotic cell is the presence of various compartments which e.g. serve to separate anabolic from catabolic metabolic pathways. In order to be able to change plants in a predetermined way one may wish to not only control the formation of a protein/enzyme with respect to a certain tissue, developmental or environmental condition (as guaranteed by the promoter used) but also to control its subcellular location within the cell. Thus the idea of targetting proteins to a predetermined destination within the cell is a very attractive one.

Trafficking of nuclear-encoded proteins within a eucaryotic cell occurs in several ways depending upon the final destination of the protein. In the case of proteins destined to the mitochondria or the chloroplast they are synthesized on free polysomes and given an N-terminal extension (transit peptide) which directs them into either the chloroplast or the mitochondrion where the transit peptide is cleaved off during the import process. A large bulk of the proteins is destined to move through the endoplasmic reticulum/Golgi pathway. They either become secreted into the extracellular space, become part of the plasma membrane, stay in the ER/Golgi complex or move into the vacuole. This large and complex class of proteins is believed to be cotranslationally imported into the lumen of the endoplasmic reticulum as a first step with further sorting to occur in the cis- and trans-Golgi. Again all these proteins contain a N-terminal extension (signal peptide) necessary to direct the nascent polypeptide chain to specific receptors present on the membrane of the endoplasmic reticulum.

By fusing DNA-sequences encoding the N-terminal extension of proteins destined to the chloroplast or the mitochondrion to reporter genes, chimeric genes have been constructed which, after addition of plant promoters and poly-adenylation signals resulted in the formation of fusion proteins in transgenic plants. Moreover these proteins were observed not to stay within the cytosol but rather to move into different organelles, the type of organelle being determined by the origin of the N-terminal sequence added<sup>8,9</sup>. As more and more transit peptides from nuclear encoded, chloroplast or mitochondrion located proteins have been identified, numerous possibilities for the creation of chimeric proteins exist which makes the targetting of foreign proteins into either chloroplasts or mitochondria of transgenic plants a fairly straightforward experiment.

The situation is slightly different for proteins cotranslationally taken up into the endoplasmic reticulum and subsequently distributed among the vacuole, the plasma membrane, the extracellular space and the ER-Golgi complex. With respect to directing proteins into the lumen of the endoplasmic reticulum, the same scheme could be applied. Fusion of the N-terminal extension (signal peptide) of vacuolar or secreted proteins to the foreign protein resulted in its uptake into the ER<sup>10</sup>. With respect to the further sorting however a couple of questions still have to be answered. Thus there is only one example where in transgenic plants a foreign protein could be directed into the vacuoles<sup>11</sup> by fusing a very large part (146 aa) of a vacuolar plant protein to the N-terminus of the reporter protein. In other cases it has been shown that the last 10 - 12 amino acids located at the C-terminus would be responsible for vacuolar targetting (cf. 12 for a review).

Secretion of proteins into the extracellular space seems to occur if no further signal in addition to the signal peptide is present. Secretion of chimeric proteins only

**THIS PAGE BLANK (USr .**



given the signal peptide of a plant protein has been demonstrated in transgenic plants<sup>13,14</sup>.

### Inactivation of the Expression of Endogenous Genes in Transgenic Plants

In addition to being able to add new traits to a plant, the ability to inhibit the manifestation of some unwanted characteristics obviously represents a very desirable trait. This has been achieved in an efficient way via introduction of a chimeric gene giving rise to the formation of an RNA strand complementary to the strand produced from the endogenous gene in the transgenic plant (anti-sense RNA approach)<sup>15</sup>. The anti-sense RNA is complementary to the target mRNA which will be inhibited with respect to its formation/biological activity. It is assumed (though not proven) that a duplex RNA will be formed between the mRNA resulting from the endogenous gene and the anti-sense RNA being produced from the introduced gene which, by an unknown mechanism, leads to the inactivation and the disappearance of both the sense- and the anti-sense mRNA.

The anti-sense RNA mediated inhibition of the expression of endogenous genes has been demonstrated for an increasing number of genes<sup>16</sup>.

One further advantage of the anti-sense RNA inhibited gene expression is that, as a rule, plants independently transformed with the anti-sense RNA coding gene give rise to different degrees of inhibition. Thus it is not only possible to suppress the expression of the endogenous gene to near completeness (as is the case for gene disruption via homologous recombination) but also to obtain transgenic plants differing widely in their degree of inhibition.

## 3 MODULATION OF STARCH QUALITY AND QUANTITY IN TRANS-GENIC PLANTS

### Molecular Approaches to Reduce Starch Synthesis in Potato Tubers

ADP-glucose formed by the enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase from glucose-1-phosphate and ATP is the precursor used by the starch synthases for the formation of linear  $\alpha$ -1,4-glucans. ADP-glucose pyrophosphorylase has been described as the enzyme controlling the rate of starch biosynthesis<sup>17</sup>. We therefore decided to try to inhibit starch biosynthesis via inhibiting the activity of the ADP-glucose pyrophosphorylase. To this end cDNA's encoding both subunits of the ADP-glucose pyrophosphorylase were cloned from potato using heterologous probes from maize<sup>18</sup>.

Subsequently, chimeric genes expressing an anti-sense RNA from both cDNA's were introduced into potato by *Agrobacterium*-mediated gene transfer and transgenic potato plants regenerated.

These plants were subsequently analyzed on the RNA, protein and enzyme activity level for inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase gene expression. Out of a collection of 50 independently transformed potato plants, 4 transgenic plants were identified which displayed only 2-5% of the wild-type activity of the ADP-glucose pyrophosphorylase. In parallel to this reduction in the enzymic activity, the tuber starch content was reduced to 2-5% of wild-type levels<sup>19</sup>.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

As a result of the inhibition of starch biosynthesis, a dramatic change in the phenotype of the tubers formed was observed. Whereas in the case of wild-type plants the average number of tubers grown under standardized greenhouse conditions amounts to about 8-15, potato plants unable to synthesize starch produced 70-90 tubers. A second significant change concerns the size of the tubers, which is significantly reduced in the starch-less tubers compared to tubers from wild-type plants.

Inhibition of starch biosynthesis in tubers of transgenic potato plants thus has profound effects on number and size of this sink organ. The increase in number and the decrease in size of an individual tuber can be interpreted as indicating a reduction in sink strength. This interpretation is based on the observation that upon induction of the tuberization process in potato, multiple tuber-forming primordia are initiated. However in wild-type plants only a minor proportion of these tuber primordia develop into mature tubers<sup>20</sup>. In wild-type plants normally only one or two tubers are formed per stolon; the anti-sense plants developed up to ten. In addition, alternating tuber-stolon structures were observed in plants which had low ADP-glucose pyrophosphorylase activity, a phenomenon which very rarely occurs in control plants grown under standard greenhouse conditions.

Accepting the concept of competing sinks, this can be explained by assuming that very early during tuber growth some tubers have gained a competitive advantage and can thus outcompete the other tuber primordia with respect to carbohydrate which therefore will stop their further development. The observation that starch-less potato plants form significantly more tubers indicates that the creation of a competitive advantage with respect to sink strength could well be due to the action of the ADP-glucose pyrophosphorylase, making this enzymic activity therefore a possible determinant for sink strength. It is obvious that this interpretation is still speculative at this level and that further experiments are needed to further substantiate this model.

#### Molecular Approaches to Increase Starch Quantity in Transgenic Tubers of Potato

A major breakthrough with respect to quantity was recently reported by a group working at Monsanto. The enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase represents one of the major control points in the starch biosynthesis pathway. The plant enzyme is subject to feed-back inhibition by several metabolites including phosphate<sup>17</sup>. Glycogen-producing bacteria contain a very similar enzyme also catalyzing the formation of ADP-glucose from ATP and glucose-1 phosphate. By expressing a mutated form of the *E. coli* ADP glucose pyrophosphorylase which is changed in various of its allosteric properties in amyloplasts of transgenic potato plants, Kishore et al<sup>21</sup> were able to create potato plants which in their tubers display increased starch and a higher dry matter content. On average these tubers contain 24% higher level of dry matter relative to controls with some lines containing nearly 50% higher levels.

#### Molecular Approaches to Alter the Starch Quality in Potato Tubers - Anti-Sense Inhibition of the Granule Bound Starch Synthase

Starch is synthesized by the combined action of the starch synthases and the branching enzymes. The starch synthases catalyze the polymerisation of ADP-glucose to linear  $\alpha$ -1,4-glucans, whereas the branching enzymes introduce branch points by releasing small segments from a linear chain and reattaching them to a glucan through the formation of  $\alpha$ -1,6-glucosidic bonds, which leads to the formation of amylopectin.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Mutants lacking one isoform of the starch synthases, the insoluble or granule bound form, synthesize an essentially amylose free-starch<sup>17</sup>.

A cDNA clone encoding the GBSS from potato (a kind gift from M. Hergersberg and U. Wienand, Cologne) was expressed in anti-sense orientation in transgenic potato plants driven by a tuber-specific promotor. Plants which showed almost complete reduction of the GBSS protein synthesized, like the classical mutants, starch which has a very low amylose content (less than 5%). This is in agreement with data from another group pursuing the same approach<sup>22</sup>. The total starch content in the tubers was not significantly altered. Field trials showed that the anti-sense RNA mediated inhibition of the amylose formation was stable<sup>23</sup>.

### Anti-Sense Inhibition of the Starch Branching Enzyme

Branching enzyme (BE) normally appears in two isoforms in plants. Mutants of maize and pea have been characterized where the activity of one isoform of the enzyme is missing, leading to an increase of the amylose content (from 20-30% up to 70%) of the synthesized starch<sup>17</sup>. In potato tubers only one form of BE has been described<sup>24</sup>.

Potato plants were transformed with a construct carrying a cDNA for BE<sup>25</sup> in anti-sense-orientation behind the 35S CaMV promotor. Those plants which did not express detectable amounts of BE, as determined by Western blotting, were selected for further analysis. Surprisingly neither the amylose content of the starch in the tubers of these plants, nor the total starch content of the tubers was altered.

One possible explanation is that there is another isoform of the enzyme in potato tubers, which has not been characterized so far. Evidence for that is that the residual branching enzyme activity in the mutant plants lies between 10-20% of control plants, which is significantly higher than the BE protein levels which can be detected on western-blot.

## 4 CONCLUSIONS

As briefly described in this contribution, the tools have been developed to modify higher plants by genetic engineering methods which among other aspects will also allow changes in starch quality and quantity in transgenic plants. Whether or not this will lead to a new technology of economic importance will mainly depend upon the public acceptance of transgenic plants.

## 5 REFERENCES

1. P. Zambryski, J. Tempe and J. Schell, *Cell*, 1989, **56**, 193.
2. I. Potrykus, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1991, **42**, 205.
3. A. Crossway, J.V. Oakes, J.M. Irvine, B. Ward, V.C. Knauf and C.K. Shewmaker, *Mol. Gen. Genetics*, 1986 **202**, 179.
4. M. Caboche, *Physiol. Plant*, 1990 **79**, 173.
5. T.M. Klein, E.D. Wolf, R.D. Wu and J.C. Stanford, *Nature*, 1987, **327**, 70.
6. J. Edwards and G. Coruzzi, *Ann. Rev. Genetics*, 1990, **24**, 275.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8. K. Keegstra, L. Olsen and S. Theg, Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 1989, **40**, 471.
9. M. Boutry, F. Nagy, C. Poulson, K. Aoyago and N. Chua, Nature, 1987, **328**, 340.
10. G. Iturriaga, R. Jefferson and M. Bevan, The Plant Cell, 1989, **1**, 381.
11. U. Sonnewald, M. Brauer, A. von Schaewen, M. Stitt and L. Willmitzer, The Plant Journal, 1991, **1**, 95.
12. F. Sebastiani, L. Farrell, M. Vasquez and R. Beachy, Eur. J. Biochem., 1991, **199**, 441.
13. C. Dorel, T. Voelker, E. Herman and M. Crispeels, J. Cell Biol., 1989, **108**, 327.
14. A. von Schaewen, M. Stitt, R. Schmidt, U. Sonnewald and L. Willmitzer, EMBO J. 1990, **2**, 3033.
15. A. Moffat, Science, 1991, **253**, 510.
16. A. van der Krol, J. Mol and A. Smitje, BioTechniques, 1988, **6**, 958.
17. J. Preiss, 'The biochemistry of plants', Academic Press, New York, 1988, Vol. 14, pp.181.
18. B. Müller-Röber, J. Koßmann, C. Hannah, L. Willmitzer and U. Sonnewald, Mol. Gen. Genetics, 1990, **224**, 136.
19. B. Müller-Röber, U. Sonnewald and L. Willmitzer, EMBO J. 1992, **11**, 1229.
20. P.H. Li, 'Potato Physiology', Academic Press, New York, 1985.
21. S. Kishore, International Patent Application WO 91/19806, 1991.
22. R. Visser, I. Somhorst, G. Kuipers, N. Ruys, W. Feenstra and E. Jacobsen, Mol. Gen. Genetics, 1991, **225**, 289.
23. G.J. Kuipers, J. Vreem, H. Meyer, E. Jacobsen, W. Feenstra and R. Visser, Euphytica, 1992, **59**, 83.
24. D. Borovsky, E.E. Smith and W.J. Whelan, Eur. J. Biochem., 1975, **59**, 615.
25. J. Koßmann, R.G.F. Visser, B. Müller-Röber, L. Willmitzer and U. Sonnewald, Mol. Gen. Genet., 1991, **230**, 39.

Starch synthesis in transgenic plants.

Willmitzer L; \*\*\*Kossmann J\*\*\* ; Mueller-Roeber B; Sonnewald U  
 Inst. Genbiol. Forschung Berlin GmbH, Ihnestr. 53, W-1000 Berlin 33,  
 GER  
 Meuser, F., D. J. Manners and W. Seibel (Ed.). Plant polymeric  
 carbohydrates; International Symposium, Berlin, Germany, July 1-3,  
 1992. xiii+295p. Royal Society of Chemistry: Cambridge, England, UK.  
 0 (0). 1993. 33-39. ISBN: 0-85186-645-X  
 Book; Conference

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# Chapter 12

Starch synthesis

## Enhancing Carbon Flow into Starch: the Role of ADPglucose Pyrophosphorylase

Joseph M. Anderson, Thomas W. Okita and Jack Preiss

Starch is an important end-product of carbon fixation during photosynthesis and the control of starch metabolism has been the subject of many recent reviews (Preiss, 1982, 1988; Preiss et al., 1985; Beck and Zeigler, 1989; Fincher, 1989). Much of our knowledge of starch metabolism is based on those biochemical events which occur in photosynthetic leaf tissue. In leaf tissue, starch metabolism is a dynamic process where the glucan polymer is synthesized in the light during the active period of photosynthesis and degraded during the dark. Control of starch synthesis in leaf tissue occurs at a key enzymatic step catalyzed by ADPglucose pyrophosphorylase. This enzyme which catalyzes the formation of ADPglucose, the sugar nucleotide substrate for starch synthase, is allosterically regulated by the relative concentrations of the activator molecule, 3-phosphoglycerate (3-PGA), and the inhibitor, inorganic phosphate (Pi) in the stromal compartment (Preiss, 1982, 1988). The functional significance of this allosteric regulation of ADPglucose pyrophosphorylase by these small effector molecules in the control of starch biosynthesis was demonstrated by the studies of Steup et al. (1976) and Heldt et al. (1977). Evidence obtained from both intact leaf and chloroplast systems supports the hypothesis that the ratio of 3-phosphoglycerate to Pi controls the activation of ADPglucose pyrophosphorylase and hence carbon flow into starch *in vivo*.

In contrast to leaf tissue, information on starch metabolism in non-photosynthetic storage organs, e.g. the potato tuber, is rather limited. Due to the common ontogeny of chloroplasts and amyloplasts, the specialized starch accumulating plastids of non-photosynthetic storage organs, it is generally assumed that the events leading to starch biosynthesis in amyloplasts were identical to that observed in chloroplasts (Liu and Shannon, 1981; Jenner, 1982). Although both types of plastid probably share many enzymatic reactions, it is unlikely that the steps leading to starch biosynthesis and control of this process would be identical in these two ontological-related organelles. Amyloplasts and chloroplasts differ in two distinct properties which have profound implications with respect to carbon metabolism. First, unlike the more autonomous chloroplast which generates its own carbon and energy via CO<sub>2</sub> fixation and photophosphorylation, the amyloplast is dependent on the cytoplasm for both carbon and energy, the latter either directly in the form of ATP or formed through glycolysis of imported carbon (Ngerprasisiri et al., 1989). Secondly, starch

Sowokinos, J.K., Shea, I. and Sleeper, M.E. (1989) An enzyme system instrumental in regulating sweetening in genetically diverse potato clones. *Proceedings of the First International Symposium on the Molecular Biology of the Potato*, Bar Harbor, Maine, p. 76

Stitt, M. (1987) Fructose 2,6-bisphosphate and plant carbohydrate metabolism. *Plant Physiology* 84:201-204

Stitt, M. (1989) Product inhibition of potato tuber pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase by phosphate and pyrophosphate. *Plant Physiology* 89:628-633

Thompson, J.E. (1988) The molecular basis for membrane deterioration during senescence. In: Noodin, L.D. and Leopold, A.C. (eds), *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press, New York, pp. 51-83

Timm, H., Yamaguchi, M., Clegg, M.D. and Bishop, J.C. (1968) Influence of high-temperature exposure on sugar content and chipping quality of potatoes. *American Potato Journal* 45:359-365

Turner, D.H. and Turner, J.F. (1958) Uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase of pea seeds. *Biochemical Journal* 69:448-452

Tyson, R.H. and ap Rees, T. (1988) Starch synthesis by isolated amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* 175:33-38

van Schaftingen, E. and Hers, H.-G. (1983) Fructose 2,6-bisphosphate in relation with the resumption of metabolic activity in slices of Jerusalem artichoke tubers. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 164:195-200

Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R. and Hers, H.-G. (1982) A kinetic study of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. *European Journal of Biochemistry* 129:191-195

Weiner, H., Stitt, M. and Heldt, H.W. (1987) Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 893:13-21

Wetstein, H.Y. and Sterling, C. (1978) Integrity of amyloplast membranes in stored potato tubers. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 90:373-378

Workman, M., Cameron, A. and Twomey, J. (1979) Influence of chilling on potato tuber respiration, sugar, o-dihydroxyphenolic content and membrane permeability. *American Potato Journal* 56:277-288

Workman, M. and Twomey, J. (1970) The influence of storage on the physiology and productivity of Kennebec seed potatoes. *American Potato Journal* 47:372-378

Yamaguchi, M., Timm, H., Clegg, M.D. and Howard, F.D. (1966) Effect of stage of maturity and postharvest conditions on sugar conversion and chip color quality of potato tubers. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 89:456-463

p.p. 159-180  
Inv.  
the molec.  
and cell.  
Biol. of  
the potato,  
the  
Jayda et al.,  
eds.  
C.A.B. International:  
International:  
Wallingford, UK  
(1990)

FILE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

metabolism in leaf tissue is strictly controlled by enzymatic regulation, whereas in non-photosynthetic storage organs, synthesis and degradation of starch are temporally separated to specific stages of plant development. In potato, starch synthesized during tuberization does not serve as an immediate energy and carbon reserve but rather as longer term storage to be degraded and mobilized during the sprouting phase.

During the tuberization period, the bulk of carbon assimilates from photosynthesis, mainly in the form of sucrose, is converted into starch which may comprise up to 70% of the dry weight of the tuber (Jenner, 1982). The biosynthesis and accumulation of starch during tuberization is, therefore, a significant process with regard to the overall productivity of this plant. Improved control of starch biosynthesis as well as starch structure may lead to enhanced sink capacity and strength of this storage tissue. Such an increase in the ability of this tissue to assimilate photosynthate and convert it into starch may, in turn, improve the capacity of the potato plant to translocate sucrose and increase net photosynthesis.

Knowledge of starch metabolism in potato tubers has increased substantially during the past few years. As sucrose plays an important role in tuber starch synthesis this chapter will give a brief summary of carbon flow from sucrose and its subsequent metabolism in sink tissue. The major emphasis of this chapter, however, will be a review on the current information on the control of starch synthesis in tuber tissue at the level of ADPglucose pyrophosphorylase, the key regulatory enzyme in this process. Evidence on its presumptive regulatory role in starch biosynthesis, its subcellular localization within the cell, general structural features, and present attempts to clone the respective genes are discussed.

## The Flow of Carbon into Starch in Potato Tubers

The pathway of carbon flow into starch appears to be a relatively straightforward process. Sucrose serves as the major transport form of carbon in most plant species (Cronshaw et al., 1986; Lucas and Madore, 1988) and, therefore, has a central metabolic role in starch metabolism in storage tissues (apices, 1988). Cleavage of sucrose can be accomplished either by sucrose synthase or invertase. Although tuber tissues contain invertases, the levels are low as compared to sucrose synthase activities and, therefore, invertases probably play only a secondary role in the metabolism of translocated sucrose (Sung et al., 1989). The reaction catalyzed by sucrose synthase (Figure 12.1, reaction 1) is believed to be the predominant pathway of sucrose cleavage forming fructose and UDPglucose (Sung et al., 1989). The importance of sucrose synthase in starch biosynthesis in storage tissue is demonstrated by the phenotype displayed by maize endosperm mutants defective in this enzyme activity (Chourey and Nelson, 1976). The seeds have a collapsed endosperm due to a 50% reduction in starch content as compared to the wild-type. The pivotal role of this enzyme in the metabolism of translocated sucrose led Sung et al.

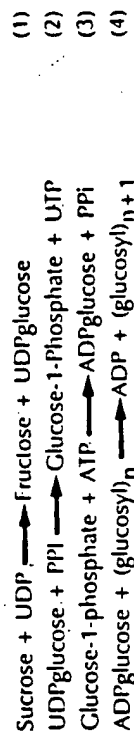


Figure 12.1 Key reactions in starch biosynthesis.

biochemical basis of sink strength in potato tubers. The sugar nucleotide, UDPglucose, is further metabolized by UDPglucose pyrophosphorylase (Figure 12.1, reaction 2) to produce the glycolytic intermediate Glc-1-Pi which serves as a substrate together with ATP for the ADPglucose pyrophosphorylase reaction. Evidence that ADPglucose is the dominant substrate for starch synthase (Figure 12.1, reaction 4) has been discussed in a number of recent reviews (Preiss, 1982, 1988).

The initial reactions of sucrose cleavage (Figure 12.1, reactions 1 and 2) and starch synthesis (Figure 12.1, reactions 3 and 4) as well as the intermediate steps between these two processes are well understood in photosynthetic tissue (Preiss, 1988). In leaves, the predominant metabolite transporter between the cytosol and plastid compartments is the phosphate translocator which exchanges triose phosphates and Pi. Other glycolytic intermediates, including Glc-1-P, are either poorly transported across the plastid membrane or not transported at all (Bucke et al., 1966). During CO<sub>2</sub> fixation, the immediate product, 3-PGA, is either incorporated into starch via gluconeogenesis in the plastid compartment or transported to the cytosol to form a variety of chemical constituents necessary for plant growth. In storage tissue, the exchange of carbon between the cytosol and plastid has yet to be clearly defined although recent studies indicate significant differences in the biochemical properties between amyloplasts and chloroplasts. Tyson and ap Rees (1988) showed that [<sup>14</sup>C]-Glc-1-P, but not the triose phosphate, [<sup>14</sup>C]-dihydroxyacetone phosphate, was effectively incorporated into starch in intact wheat endosperm amyloplasts. This finding was substantiated by Keeling et al. (1988) who examined the extent of redistribution of [<sup>13</sup>C] between carbon atoms 1 and 6 of glucose incorporated into starch when wheat endosperm tissue was incubated with sucrose labeled at either 1-[<sup>13</sup>C] or 6-[<sup>13</sup>C] of the glucose or fructose moiety. Their results support the view that hexose monophosphates, rather than triose phosphates, are translocated into the amyloplast and incorporated into starch. In contrast, Echeverria et al. (1988) showed that maize endosperm amyloplasts were able to convert labeled triose phosphates into starch. Similarly, Mohabir and Johns (1988) have suggested that amyloplasts from potato tubers do contain a phosphate translocator as presumably triose phosphates generated by the addition of [<sup>14</sup>C]-Fru-1,6-P<sub>2</sub>-aldolase, triose phosphate isomerase and Fru-2,6-P<sub>2</sub> to an intact amyloplast

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

action were converted into starch. The conclusion from both studies, however, should be analyzed cautiously as the amyloplast fractions showed substantial cytosolic enzyme contamination which may have led to hexose monophosphate reduction. Although it is quite possible that the amyloplasts of potato tuber and maize endosperm differ from those of wheat endosperm tissue in their capacity to transport specific metabolites, further analysis is clearly needed.

### The Role of ADPglucose Pyrophosphorylase in Tuber Starch Biosynthesis

It is well established that the allosteric behavior of ADPglucose pyrophosphorylase is responsible for the net flow of carbon into starch in leaf tissue. During photosynthesis, 3-PGA levels increase due to  $\text{CO}_2$  fixation while Pi levels decrease because of corresponding increases in the levels of the Calvin cycle intermediates as well as elevated levels of ATP due to photophosphorylation (Heldt et al., 1977). The increase in 3-PGA/Pi ratio, therefore, results in conditions conducive to an active form of ADPglucose pyrophosphorylase and in turn formation of ADPglucose, the substrate for starch synthase (Heldt et al., 1978 and 1982). In the dark, Pi levels increase with corresponding increases in 3-PGA levels which result in an inactive form of the enzyme and thereby suppress ADPglucose formation. These changes in the stromal 3-PGA/Pi ratios and their effect on ADPglucose pyrophosphorylase, therefore, readily account for the diurnal oscillation of starch synthesis observed in leaf tissue.

As mentioned earlier, the tuber amyloplast is a specialized plastid which, unlike the chloroplast, is largely dependent upon the import of carbon and ATP from the cytoplasm. Nevertheless, as observed earlier for the leaf ADPglucose pyrophosphorylase, the activity of the tuber enzyme is also controlled by these effector molecules. Sowokinos and Preiss (1982) have shown that 3-PGA is absolutely required for ADPglucose pyrophosphorylase activity and that Pi is an effective inhibitor of the synthesis reaction. The similarity in both catalytic and allosteric properties of the leaf and tuber enzyme, however, raises the question whether the enzyme in tuber tissue and, in turn, starch synthesis is controlled by these effector molecules. One would not expect that the levels of these effectors would oscillate in non-photosynthetic tuber cells as they do in light-dark treated leaf tissue. Two studies, however, have shown that the levels of Pi influence the extent of starch synthesis in potato tubers. Mohabir and John (1988) have shown that net incorporation of labeled metabolites into starch by intact cell-free potato tuber amyloplasts was affected by Pi. They observed a 20 to 33% decrease in the level of starch synthesized compared to the control in which exogenous Pi was not added. The role of Pi in tuber starch synthesis was also evaluated by an indirect Pi sequestration experiment (Hnilo and Okita, 1989). Previous studies by the Walker laboratory (Chen-She et al., 1975; Herold et al., 1975) have shown that in many C3 plant species, mannose is an effective sequestrator of cytoplasmic Pi. It is readily assimilated by plant cells and converted into mannose

6-P, a product which is not further metabolized. The net result is the reduction of cytoplasmic Pi levels which would in turn reduce the Pi levels in the plastid compartment and hence stimulate starch synthesis. To determine what effect reduction of cytoplasmic Pi levels had on starch synthesis, tuber discs were fed [ $^{14}\text{C}$ ]-sucrose in the presence and absence of 10 mM mannose and the extent of sucrose uptake and its conversion into starch measured. Although the presence of mannose had little effect on the total uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]-sucrose, it increased the incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]-sucrose into starch by 50%. This result indicates that reducing the level of cytoplasmic Pi by sequestration into mannose 6-P increases starch synthesis in potato tubers. The decrease in cytoplasmic Pi levels would presumably lower the Pi content in the amyloplast compartment resulting in increased ADPglucose pyrophosphorylase activity. Although inconclusive, the results of these studies are consistent with the view that the 3-PGA/Pi control mechanism of ADPglucose pyrophosphorylase activity is operational *in situ* in tuber cells.

### Immunocytochemical Localization of ADPglucose Pyrophosphorylase

The chloroplast has been shown by sucrose density gradient fractionation studies to specifically contain the enzymes directly involved in starch synthesis, i.e. ADPglucose pyrophosphorylase, starch synthase, and starch branching enzyme (Okita et al., 1979). Similar biochemical fractionation studies have been extremely difficult to carry out with amyloplasts as these organelles contain large starch grains that disrupt the integrity of the membranes even under very mild centrifugal forces. Mohabir and John (1988) have shown that a fraction enriched for intact tuber amyloplasts contained the starch biosynthetic enzymes. Similar conclusions were also reached with isolated intact amyloplasts of soybean (MacDonald and ap Rees, 1983), cauliflower buds (Journet and Douce, 1985), maize endosperm (Echeverria et al., 1985, 1988) and wheat endosperm (Entwistle et al., 1988). To definitively show that ADPglucose pyrophosphorylase is localized in the amyloplast, Kim et al. (1989) employed an immunocytochemical study at the light microscope level, which did not require the isolation of intact amyloplasts. Sections (1-2 mm) of potato tubers (40-50 g) were fixed and embedded in L. R. White resin from which 1  $\mu\text{m}$  thick sections were prepared. These sections were incubated with antiserum prepared against the spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase holoenzyme. Analysis of Western blots containing crude potato extracts with this antibody showed specific reaction with only the ADPglucose pyrophosphorylase subunits. The bound antibody was detected with either a secondary fluorescent antibody (Figure 12.2, panel A) or protein A tagged with gold particles (Figure 12.2, panel B). Visualization at the light microscopy level of the reacted protein A-gold particles was conducted by silver enhancement. The results of the immunocytochemical analyses (Figure 12.2) indicated that ADPglucose pyrophosphorylase is specifically localized only to the amyloplasts at the limits of resolution for this technique. The immunocytochemical approach not only confirms the results obtained from the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

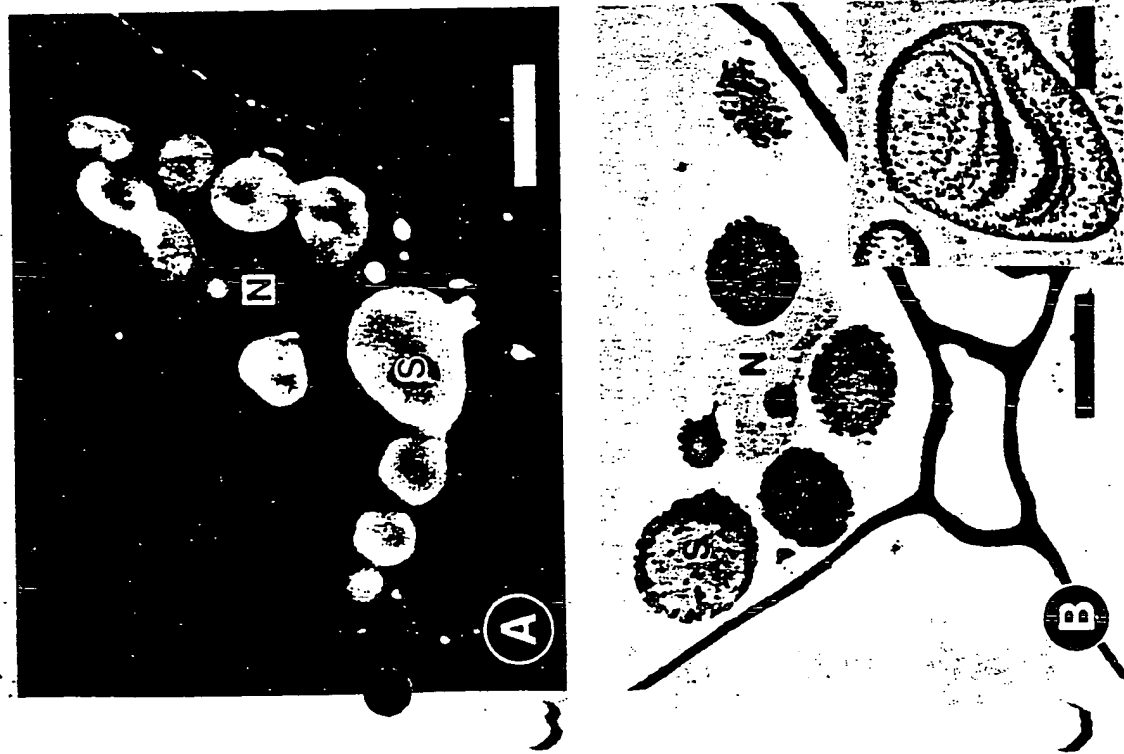


Figure 12.2 Immunocytochemical staining for ADPglucose pyrophosphorylase utilizing antiserum prepared against the spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase holoenzyme. This bound antibody was detected with either (Panel A) anti-rabbit goat IgG labeled with a fluorescent tag or (Panel B) protein A conjugated with gold particles. Visualization of the gold particles was conducted by silver enhancement. Both immunofluorescent and gold particle labeling was localized solely to the amyloplasts. Inset in Panel B is a phase contrast photomicrograph of a large amyloplast demonstrating enhanced labeling along specific layers of the starch grain: N=nucleus, S=starch, bar = 10 μm.

biochemical subcellular fractionation studies (Mohabir and John, 1988) but also shows the specific spatial location of this enzyme within this organelle. In several instances, especially when the starch grain displayed fine structural detail, the ADPglucose pyrophosphorylase did not appear to be distributed randomly within this organelle. The labeling of some starch grains had an uneven distribution of pyrophosphorylase with more antibody binding to the outer edge and also on the ridges of electron-dense concentric rings displayed by some starch granules (Figure 12.2, panel B). Although the biochemical basis for this discrete localization of ADPglucose pyrophosphorylase within the starch granule is not known, perhaps these areas may be sites of active starch synthesis. These results conclusively demonstrate that the bulk of not all of the tuber ADPglucose pyrophosphorylase is localized in the amyloplast. It is apparent, therefore, that photosynthetic and non-photosynthetic tissue have both compartmentalized the site of starch biosynthesis to their respective plastids.

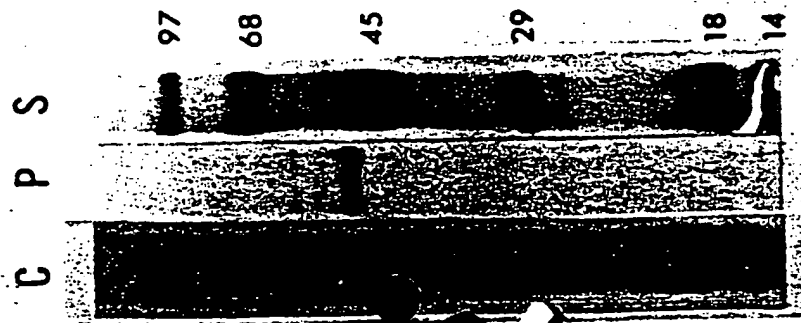
### Enzyme Structure

Although ADPglucose pyrophosphorylase is prevalent in both bacteria (for the synthesis of bacterial glycogen) and plants, the structures of these enzymes differ between these species. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, the enzyme is composed of a simple homotetramer with a subunit molecular weight of 48 kD which is encoded by a single gene locus (Preiss, 1984). Recent studies from the Preiss laboratory, however, indicate that the structure of the plant enzyme is more complex than that observed for the bacterial enzyme. Copeland and Preiss (1981) purified the spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase to apparent homogeneity and showed that it contained two dissimilar subunits. These results were substantiated and extended by Morell et al. (1987b) who conclusively showed that the two subunits with molecular weights of 54 kD and 51 kD were non-identical with respect to their N-terminal amino acid sequences and tryptic peptide maps as well as the absence of cross-reactivity with antibodies raised against each subunit. Moreover, the isolation of two independently segregating mutants of the leaf ADPglucose pyrophosphorylase in *Arabidopsis thaliana* (Lin et al., 1989a and 1989b) supported the view that the leaf enzyme is encoded by two distinct genes. In contrast, Sowokinos and Preiss (1982) purified a near homogeneous preparation of the potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase and SDS-PAGE analysis showed that the enzyme appeared to be composed of four identical 50 kD subunits with a native molecular weight of approximately 200 kD. This conclusion was supported by the work of Krishnan et al. (1986) in which a comparison of crude extracts from endosperm tissue of rice, wheat and maize by Western blot showed a single band, whereas examination of leaf tissue from these plants and spinach showed two dissimilar sized polypeptides. These results were consistent with the view that the leaf-specific ADPglucose pyrophosphorylase consisted of two distinct subunits while non-photosynthetic tissue contained a homotetrameric species. More recent studies from the Preiss laboratory (Preiss et al., 1989b), however, have shown

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Figure 12.3 SDS PAGE analysis of protein fractions during the purification of tuber ADPglucose pyrophosphorylase. Lane C, crude extract (20 µg). Lane P, purified enzyme, Mono Q fraction (1.5 µg). Lane S, protein standards.



that maize endosperm pyrophosphorylase does consist of two immunologically distinct subunits of 60 kD and 54 kD. In light of these new data we thought it necessary to re-examine the subunit structure of the tuber enzyme.

The tuber enzyme was isolated using a modified protocol described by Sowokinos and Preiss (1982) with one additional purification step using Mono-Q ion exchange chromatography (Okita et al., unpublished results). This enzyme preparation, which was estimated to be approximately 80% pure, was analyzed by SDS-PAGE (Figure 12.3) to reveal a single dominant band at about 50 kD with several very faint higher molecular weight bands. The specific activity of this enzyme was 56.9 µmol per min per mg which is 20-fold higher than that obtained in a previous study (Sowokinos and Preiss, 1982), but approximately 2-fold lower than the spinach leaf enzyme (Copeland and Preiss, 1981).

The pattern of enzyme activity following elution from the Mono-Q ion-exchange column was rather broad suggesting that the subunits of this enzyme were heterogeneous in charge. This was confirmed by high resolution 2-dimensional isoelectric focusing-SDS polyacrylamide gel electrophoresis

(O'Farrell, 1975) which resolved the purified tuber ADPglucose pyrophosphorylase into two polypeptide groups present in equimolar amounts based on the intensity of Coomassie blue staining. These two groups, besides having different net charges, also had slightly different molecular weights of approximately 51 kD and 50 kD (Figure 12.4, Panel A). The more basic 51 kD subunit appeared to be composed of at least 3 isoforms. These two different size subunit classes displayed unique proteolytic patterns after partial digestion with *Staphylococcus* V8 protease (data not shown). Western blot analysis of the 2-dimensional gels, using antisera prepared against the 51 and 54 kD subunits of spinach leaf pyrophosphorylase, also showed that immunologically these two subunits were distinct. The anti-51 kD antiserum cross-reacted strongly with the 50 kD tuber subunit, but not to the 51 kD species (Figure 12.4, panel B), whereas the anti-54 kD antiserum did not bind significantly to either subunit (Figure 12.4, panel C). Antiserum prepared against the purified tuber holoenzyme cross-reacted with both subunits (data not shown). These observations were somewhat similar to that observed for the maize endosperm specific ADPglucose pyrophosphorylase subunits (Preiss et al., 1989b). Significant cross-reactivity was evident against the 54 kD subunit by the anti-spinach leaf 51 kD subunit antiserum, whereas the larger 60 kD subunit reacted, albeit very weakly, with the anti-spinach leaf 54 kD subunit. Overall, the results of these studies indicated that the ADPglucose pyrophosphorylase from both leaf and non-photosynthetic storage tissue is composed of non-identical subunits encoded by individual genes. Moreover, based on the extent of reactivity of these subunits with the spinach leaf subunit antibodies, the smaller molecular weight ADPglucose pyrophosphorylase subunit of the potato tuber and maize endosperm holoenzymes appears to be more structurally conserved than the larger species.

It is obvious that the elucidation of the enzyme's primary structure and structure-function relationship of specific amino acid residues have important implications in efforts to engineer the tuber ADPglucose pyrophosphorylase for improved catalytic activity. The most significant result from the above discussion is that the plant enzyme, unlike the bacterial form (Preiss, 1984), is composed of two distinct subunits. In order to determine what role(s) each of the subunits play in catalytic function and allosteric control, Morell et al. (1987a, 1988) have begun analyzing the spinach leaf enzyme. They showed that pyridoxal-phosphate, an analog of the allosteric activator 3-PCA, was incorporated into both subunits of the spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase in equimolar amounts. This observation suggests that the activator binding site may be shared on both subunits. Preiss et al. (1989a) have also shown that the photo-affinity substrate analog, 8-azido-ADPglucose, binds almost exclusively to the spinach leaf 54 kD subunit indicating that the substrate binding site is either contained completely on this subunit or is shared between the subunits with the 54 kD subunit containing the reactive site for the analog.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## ADPglucose Pyrophosphorylase Gene Isolation

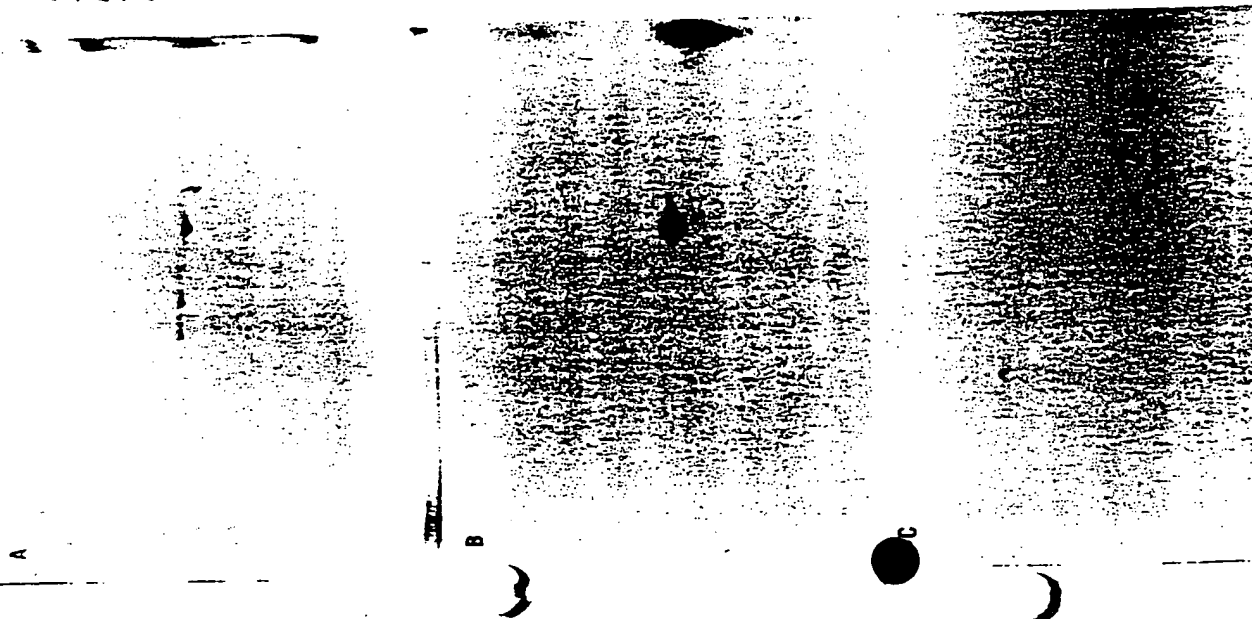
Recombinant clones for the ADPglucose pyrophosphorylase gene were first isolated for the smaller subunit of the rice endosperm specific enzyme (Krishnan et al., 1986; Anderson et al., 1989) and subsequently for the spinach leaf 51 kD subunit. More recently, Olive et al. (1989) have isolated cDNA clones for leaf and endosperm forms of this enzyme in wheat, although it is not clear what specific subunits these sequences encode. Direct sequence comparison showed that the rice endosperm and spinach leaf subunits were homologous with about 76% identity at the primary sequence level (Preiss et al., 1989a). Because of this similarity and the relatively high degree of amino acid homology (42%) to specific peptide regions of the *E. coli* enzyme (Anderson et al., 1989) we thought we could use this clone as a heterologous probe for isolating the analogous gene from potato. Preliminary Northern blot experiments, however, did not show any cross-hybridization between the rice cDNA clone and potato tuber poly(A<sup>+</sup>) RNA. Therefore, using poly(A<sup>+</sup>) RNA isolated from tubers, a cDNA expression library was prepared and screened using antiserum prepared against the purified tuber holoenzyme. A total of 24 putative clones were isolated, all of which cross-reacted with the anti 51 kD spinach leaf subunit. The amino acid sequence deduced from initial sequence data from the 5' and 3' termini of several clones as well as the complete sequence of one clone was compared to that of the spinach leaf and rice cDNA clones. These analyses showed that the cloned tuber subunit sequence was analogous to the 51 kD spinach leaf subunit (Preiss et al., 1989a) and the cloned rice endosperm-specific subunit (Krishnan et al., 1986; Anderson et al., 1989) at the amino acid level but highly divergent at the DNA level due to differences in codon usage between these different plant sequences.

The anti-potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase antibody has been shown by Western blot analysis of 2-D gels to bind to both the 50 and 51 kD subunits, with a slightly higher specificity for the more basic 51 kD subunit (data not shown). However, the results obtained from screening the tuber cDNA expression library showed that clones for the more basic 51 kD subunit were not isolated during this immunological screening. At this time we cannot explain why we have been unable to isolate a cDNA clone for the tuber 51 kD subunit. Because isolation of a 51 kD subunit cDNA clone was unsuccessful, a heterologous probe may be useful in isolating the gene from a genomic library. However, Northern blot hybridizations of leaf and tuber poly(A<sup>+</sup>) RNA using the maize *Shrunken-2* cDNA clone (Barton et al., 1986) which encodes the 60 kD ADPglucose pyrophosphorylase subunit as a heterologous probe for the potato 51 kD subunit sequence have thus far been negative.

## Developmental Expression of ADPglucose Pyrophosphorylase

The developmental expression of the gene encoding the 50 kD subunit has been examined. Results from preliminary experiments indicate that the pattern of the 50 kD subunit mRNA accumulation closely follows the level of

**Figure 12.4**  
Structural analysis of purified tuber ADPglucose pyrophosphorylase by 2-D PAGE and Western blot analyses. Mono Q 2-D PAGE system. Panel A depicts a Coomassie brilliant blue stain gel. Panel B shows a Western blot of panel A incubated with anti-51 kD subunit of spinach leaf pyrophosphorylase. Panel C represents a Western blot of panel A incubated with anti-54 kD subunit of spinach leaf pyrophosphorylase antiserum. The broad band on the right side of panel B and C is the protein standard ovalbumin, which is reactive to the IgG fraction.



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

L S T

1.8 ▶

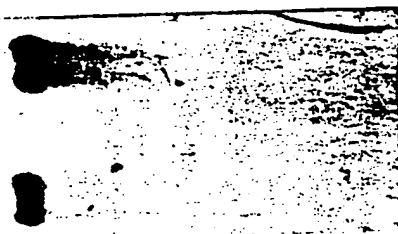


Figure 12.5 Northern blot analysis of expression of the gene encoding the 50 kD subunit of potato ADPglucose pyrophosphorylase. Poly(A<sup>+</sup>) RNA (2 µg) isolated from (L) leaf, (S) stolon, and (T) tuber was fractionated on a formaldehyde/agarose gel and transferred to a nylon membrane. The blot was then probed with a [<sup>32</sup>P]-labeled 50 kD subunit cDNA clone under stringent hybridization conditions, washed, and subjected to autoradiography.

pyrophosphorylase enzyme activity (data not shown). This observation suggests that this gene is controlled at the level of transcription. The analogous gene in wheat is also regulated transcriptionally as shown by Reeves et al. (1986) and Briaud et al. (1979). They determined that there was a direct correlation between the level of ADPglucose pyrophosphorylase mRNA, enzyme protein, and starch synthesis during wheat seed development. The expression of this gene was also examined in different tissues of the potato plant. Northern blot hybridization of ADPglucose pyrophosphorylase gene is expressed in leaf and tuber, but not in stolon tissue (Figure 12.5). These results indicate that this pyrophosphorylase gene is not only regulated at the transcriptional level during tuber development but also in a tissue specific manner. In both leaf and tuber, the sizes of mRNA transcript, 1.8 kb, as well as the mature polypeptide, 50 kD, are identical (Figure 12.6) which may indicate that the same gene is expressed in both tissues. In contrast, Krisnan et al. (1986) and Olive et al. (1989) have shown in rice and wheat that there are different genes encoding the same type subunit which are expressed either in leaf or endosperm tissue. The similarity in size of the potato tuber and leaf transcripts and its encoded polypeptides, however, does not preclude the possibility that

Figure 12.6 Western Blot analysis of ADPglucose pyrophosphorylase in tuber and leaf tissues. Lanes T and L depict crude extracts from tuber and leaf tissue, respectively, incubated with anti-spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase 'holoenzyme'.



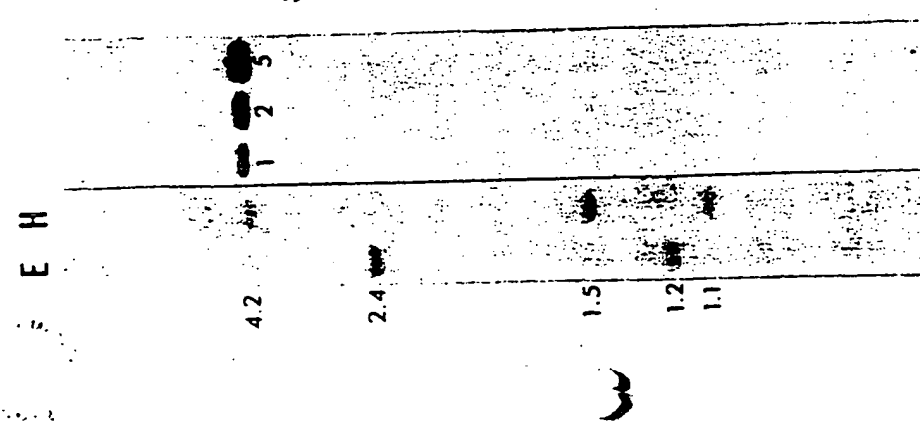
unique genes are expressed in each tissue and further analysis is clearly warranted.

### Gene Structure

Southern blot hybridization analyses show that the gene encoding the tuber pyrophosphorylase 50 kD subunit is contained within the nucleus as only nuclear DNA yielded specific hybridization signals when probed with the tuber cDNA. Specific hybridization signals representing 1-2 gene copies per haploid genome are observed. Digestion of potato nuclear DNA with *EcoRI* and *HindIII* yielded two or three hybridizable bands totaling 3.6 kb or 6.7 kb, respectively (Figure 12.7). The structure of a genomic clone encoding for the analogous rice endosperm specific gene has been recently determined (J. Anderson et al., unpublished) and spans nearly 6.5 kb. Unlike most plant genes, the ADPglucose pyrophosphorylase gene is highly complex in structure as the coding sequence is interrupted by 9 introns. The putative length of the tuber 50 kD subunit pyrophosphorylase gene suggests, therefore, that it may also have a complex exon/intron structure. The complexity of the ADPglucose pyrophosphorylase

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Figure 12.7 Southern Blot reconstruction analysis of ADPglucose pyrophosphorylase 50 kD subunit gene. 10 µg of potato nuclear DNA was digested with either EcoRI (E) or HindIII (H), resolved on a 0.8% agarose gel, and subsequently transferred to a Zetaprobe filter. This blot was then hybridized under stringent conditions to a [<sup>32</sup>P]-labelled 50 kD subunit cDNA clone. Copy number standards representing 1, 2 and 5 gene copies/haploid genome are to the right of the restriction digests.



gene structure is also shared by two other genes that encode enzymes involved in starch metabolism. These genes, one coding for sucrose synthase (Werr et al., 1985) and the other for the granule bound starch synthase (Klosgen et al., 1986), display a relatively complex gene structure possessing 16 and 14 exons, respectively. The presence of multiple introns contained within the ADPglucose pyrophosphorylase gene as well as these other genes involved in starch metabolism suggests some role in the regulation of gene expression as observed for the first intron of the alcohol dehydrogenase gene (Callis et al., 1987). Several clones have been isolated from a genomic library prepared from the potato cultivar, Russet Burbank. Further analysis will show if the genes contained in these clones have a complex structure as postulated and if there are different genes whose expression is specific for either leaf or tuber tissue.

## Sequence Comparison of Plant and Bacterial ADPglucose Pyrophosphorylase

Because the nucleotide sequence of the 50 kD tuber pyrophosphorylase cDNA clone has been determined (data not shown), direct comparisons to other known pyrophosphorylase sequences may indicate the presence of conserved peptide regions which may play a role in catalytic and/or regulatory function. Anderson et al. (1989) compared the primary sequence of a rice ADPglucose pyrophosphorylase subunit to the *E. coli* enzyme and showed that there was an overall identity of approximately 30%. A similar comparison of the primary sequences of the 50 kD potato tuber subunit and the *E. coli* subunit (Figure 12.8) also showed an overall similarity of 32% although, as previously shown for the rice endosperm subunit, the extent of similarity is not uniform throughout the primary sequences. The central region, residues 193 to 261, showed a lower level of conservation with a similarity of 28%, whereas two regions delineated by residues 1 to 192 and 252 to 359 displayed more sequence identity of approximately 42% and 39%, respectively. These latter two conserved regions have been shown to be important for the allosteric and catalytic activity of the bacterial enzyme. Residues 39 and 195 of the *E. coli* amino acid sequence have been shown to be protected from phosphorpyridoxylation by the allosteric activator Fru-1,6-P<sub>2</sub> and substrate ADPglucose (Baecker et al., 1983; Parsons and Preiss, 1978). This protection indicates that these two lysine residues are located in or near the allosteric activator and substrate binding sites, respectively. These two lysine residues are conserved in the potato tuber and rice subunit which suggests that these amino acids may also contribute to the stability of the protein conformation and possibly the regulatory and/or catalytic functions of the plant enzyme.

As the bacterial and plant enzymes catalyze the same reaction, the structural differences exhibited by these plant and bacterial proteins most likely reflect the nature of the unique allosteric regulation displayed by each enzyme. Unlike the plant enzyme which is activated by 3-PCA and inhibited by Pi, the activity of the *E. coli* enzyme is stimulated by fructose 1,6-P<sub>2</sub> and suppressed by AMP (Preiss, 1978). Other than the lower conservation displayed by residues 193 to 261, the only major structural change between the potato tuber and bacterial enzymes lies at the C-terminus where the potato tuber enzyme is extended by 23 residues. Morell et al. (1987a, 1988) have shown that pyridoxal phosphate, which mimics the allosteric effector, 3-PCA, specifically labels a lysine residue located not in the conserved N-terminal region but at the extended C-terminus of the spinach leaf subunit. This lysine residue is situated in the peptide sequence SGIVTVIKDAL which is highly conserved in the primary sequences of the rice endosperm, spinach leaf, and tuber enzyme. This result suggests that the extended C-terminus of the plant enzyme, which is absent in the bacterial sequence, plays an important role in allosteric regulation of the plant enzyme. In addition to this large structural change between the plant and bacterial enzymes, there are other smaller differences which nevertheless appear to have profound

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



P .....NSQTCIDPDASR-SVLGIIILGGGAGTRLYPLTKKRAKPAVPLGA 43  
 E MVSLEKNDHMLARQLPLKSV-ALIILAGGRGTRLKDLTNKRAKPAVHEGG 49  
  
 P NYRLIDIPVSNCLNSNI SKIYVLTQFNSASLNRLHLSRAYASNMGYKNEG 93  
 E KFRIIDFALSNCINSIGIRRGVITQVSHTLVQHIIQRGWSEFFNEEM-ND- 97  
  
 P FVEVLAAQOSPENPDWFOQTADAVRQTLWLFEEHTVLEVLILAGDHLRYM 143  
 E FVDLLPAQORMKGENCYRGTDADAVTQNLDIRRYKAEYVYVILAGDHIYKQ 147  
  
 P DYKEFIOAHRETDADITVAALPMDEKRAFGLMKIDEEGRITIEFAEKPO 193  
 E DYSRMLIDHVEKGRCTVVCNPEVPIIEASAFGVMAVDENDKTIIEFVERPA 197  
  
 P GEOLQAMKVDTTILGLDDKRAKEMPIIASMGIIYVISKDVMLNLLRDKPEG 243  
 E HPAMPNDFSKS-L-----ASMGIIYVFDADLYLLEEDDRD 233  
  
 P AN----DFGSEVIPGATSLGNR-----VQ-AYLYDGYWEDIGTIEAF 280  
 E ENSSHDFGKDLIPKITEAGLAYAHFPLSCVQSDPAEPYWRDVGTLLEY 283  
  
 P YJANLGITKKVPDFSEFYDSAPITYQPRYLPPSK-MLD-----ADVTDS 324  
 E WKANLDLA-SVVPKLDYDRNWPRTYNESLPPAKFVQDRSGSHGMTLNS 332  
  
 P VTGEGCVIKNCKIHSHVGLRSCISEGAIIEDS--LLMGADYYETDADRK 372  
 E LVSGGCVISGVSVVQSVLFESRVNVSEFCNI--DSAVLLPE/VWGRSCLRR 381  
  
 P LLAAGSV-PIGIGKNCHIKRAIIDKNARIGCN-VKIINKDNVQEAARET 420  
 E CVIDRACVPIEGMVGIGENAEEDARREY-RSEEGIVLVTREMLRKLGHKQE 430  
  
 P EGYFINSGIVTVIKDALIPSGIII 444  
 E ..... 431

Figure 12.8 Amino acid sequence conservation between the potato tuber (P) and *E. coli* (E) ADPglucose pyrophosphorylases. Residues conserved between the two proteins are indicated by vertical lines while gaps introduced to maintain homology, are denoted by dashes. Numbers on the right side of the figure indicate the number of residues from the beginning of the open reading frame in the truncated tuber cDNA clone or the translational start of the bacterial subunit. Residues essential for allosteric and/or catalytic function of the bacterial enzyme and the complementary residues in the plant subunit are in boldface. The sequence spanning residues 427 to 437 corresponding to the pyridoxylated peptide contained in the allosteric site of the spinach leaf 51 kD subunit is underlined and in boldface.

effects on the allosteric specificity of these enzymes. The tyrosine residue at position 114 in the *E. coli* enzyme when replaced by a phenylalanine, the residue present at the complementary position in the tuber and rice subunit, reduced the affinity of the enzyme for the allosteric effectors (Fru-1,6-P<sub>2</sub>) and substrates (ADPglucose and ATP) (Kumar et al., 1988; Larson et al., 1986). Furthermore, the region spanning residues 262 to 359 also contains residues which appear to have an important role in the activity of the *E. coli* enzyme. Lee et al. (1987) and Kumar et al. (1989) have shown that point mutations at residues 296 and 336 which change lysine-296(K) and glycine-336(G) to the negatively charged amino acids glutamate-296(E) and aspartate-336(D), respectively, result in a bacterial enzyme more refractive to allosteric activation by fructose-1,6-P<sub>2</sub>. It is interesting to note that the amino acids at these positions in the potato pyrophosphorylase and rice subunit are also negatively charged (Figure 12.8). Based on these observations, Anderson et al. (1989) suggested that these structural differences between the bacterial and plant enzymes, which catalyze the same reaction, may be a direct reflection of the allosteric specificity of these enzymes. Amino acid replacements at position 114 from a tryptophan(W) to phenylalanine(F) and at positions 296 and 336 to acidic residues together with the addition of a short peptide to the C-terminus may have simultaneously resulted in the loss of allosteric specificity to fructose-1,6-P<sub>2</sub> but a gain in sensitivity to 3-PCA. This hypothesis is currently being tested via construction of a recombinant enzyme composed of the primary sequence of the bacterial mutant enzyme fused to the plant C-terminal peptide and analysis of its allosteric and catalytic behavior.

## Conclusions

There have been significant advances on the biochemical and cellular aspects of ADPglucose pyrophosphorylase and understanding the role of this enzyme in starch biosynthesis in potato tuber. This information, however, immediately raises several questions concerning the regulation and structural features of this enzyme. Although the potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase is clearly controlled by the relative concentrations of 3-PCA and Pi *in vitro* (Sowokinos and Preiss, 1982) it has yet to be conclusively demonstrated to what extent, if any, that the allosteric regulation of this enzyme, operates *in vivo*, as it relates to starch synthesis. Preliminary labeling studies of potato starch using an enriched amyloplast fraction (Mohabir and John, 1988) or phosphate sequestration experiments (Hnilo and Okita, 1989) support, but do not prove, a role for Pi in starch synthesis. Clearly the concentrations of these effector molecules in amyloplasts must be measured in order to assess their effect on ADPglucose pyrophosphorylase activity and hence starch synthesis. Moreover, information on the metabolite transport capabilities of potato tuber amyloplasts is insufficient at present and needs to be further defined. The structure of the potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase as shown previously for the spinach leaf and maize endosperm enzymes is now known to consist of

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

two non-identical subunits encoded by unique genes. The question, therefore, is why does the plant enzyme require two distinct subunits to catalyze the same reaction as the homotetrameric bacterial enzyme, and hence, what are the functions of these subunits? Sequence comparisons, such as the one discussed above, together with definition of the allosteric and catalytic sites using chemical probes, may indicate which amino acid residues are important in enzyme structure and allosteric and/or catalytic function. Such information should prove valuable in future efforts to enhance carbon flow into starch and improve overall plant productivity.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the U.S. Department of Energy (DE-FG06-87ER13699), the McKnight Foundation and Project 0590, College of Agriculture and Home Economics Research Center, Washington State University to T.W.O. and the National Science Foundation (DMB86-10319), the McKnight Foundation, and the USDA/DOE/NSF Plant Science Program to J.P.

#### Literature Cited

- Anderson, J.M., Hnilo, J., Larsen, R., Okita, T.W., Morell, M. and Preiss, J. (1989) The encoded primary sequence of a rice seed ADPglucose pyrophosphorylase subunit and its homology to the bacterial enzyme. *Journal Biological Chemistry* 264:12238-12242
- ap Rees, T. (1988) Hexose phosphate metabolism by nonphotosynthetic tissues of higher plants. In: Preiss, J. (ed) *The Biochemistry of Plants*, Vol 14, Academic Press, Inc., San Diego, pp. 1-33
- Baecker, P.A., Furlong, C.E. and Preiss, J. (1983) Biosynthesis of bacterial glycogen: primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose synthetase as deduced from the nucleotide sequence of the *glgC* gene. *Journal of Biological Chemistry* 258:5084-5088
- Barton, C., Yang, L., Galvin, M., Sengupta-Gopalan, C. and Borelli, T. (1986) Isolation of the *Shrunken-2* and *Brittle-2* genes from maize. In: (eds) Shannon, J.C. Knevel, D.P., Boyer, C.D. *Regulation of Carbon and Nitrogen Reduction and Utilization in Maize*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 363-365
- Beck, E. and Ziegler, P. (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:95-117
- Briarty, L.G., Hughes, C.E. and Nevers, A.D. (1979) The developing endosperm of wheat: a stereological analysis. *Annals of Botany* 44:641-658
- Bucke, C., Walker, D.A. and Baldry, C.W. (1966) Some effects on sugars and sugar phosphates on carbon fixation by isolated chloroplasts. *Biochemistry Journal* 101:636-641
- Callis, J., Fromm, M. and Walbot, V. (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes and Development* 1:1183-1200

- Chen-She, S.-H., Lewis, D.H. and Walker, D.A. (1975) Stimulation of photosynthetic starch formation by sequestration of cytoplasmic orthophosphate. *New Phytology* 74:383-392
- Chourey, P.S. and Nelson, O.E. (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the *shrunken1* mutation in maize. *Biochemical Genetics* 14:1041-1055
- Copeland, L. and Preiss, J. (1981) Purification of spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* 68:996-1001
- Cronshaw, J., Lucas, W.J. and Ciaquinta, R.J. (eds) (1986) *Phloem Transport*, A.R. Liss, New York
- Echeverria, E., Boyer, C., Liu, K.-C. and Shannon, J.C. (1985) Isolation of amyloplasts from developing maize endosperm. *Plant Physiology* 77:513-519
- Echeverria, E., Boyer, C., Thomas, P.A., Liu, K.-C. and Shannon, J.C. (1988) Enzyme activities associated with maize kernal amyloplasts. *Plant Physiology* 86:786-792
- Entwistle, G., Tyson, R.H. and ap Rees, T. (1988) Isolation of amyloplasts from wheat endosperm. *Phytochemistry* 25:2033-2039
- Fincher, G.B. (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:305-346
- Heldt, H.W., Chon, C.J., Maronde, D., Herold, A., Stankovic, Z.S., Walker, D.A., Kraminer, A., Kirk, M.R. and Heber, U. (1977) Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiology* 59:1146-1155
- Herold, A., Lewis, D.H. and Walker, D.A. (1975) Sequestration of cytoplasmic orthophosphate by mannose and its differential effect on photosynthetic starch synthesis in C3 and C4 species. *New Phytology* 76:397-407
- Hnilo, J. and Okita, T.W. (1989) Mannose feeding and its effect on starch synthesis in developing potato tuber discs. *Plant Cell Physiology* 30:1007-1010
- Jenner, C.F. (1982) Storage of starch. In: Loewus, F.A. and Tanner, W. (eds.), *Plant Carbohydrates I*, Springer-Verlag, Berlin, pp 700-747
- Journel, E.P. and Douce, R. (1985) Enzymatic capacities of purified cauliflower bud plastids for lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiology* 79:458-467
- Keeling, P.L., Wood, J.R., Tyson, R.H. and Bridges, I.G. (1988) Starch biosynthesis in developing wheat grain. *Plant Physiology* 87:311-319
- Kim, W.T., Franceschi, V.R., Okita, T.W., Robinson, N., Morell, M. and Preiss, J. (1989) Immunocytochemical localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing potato tuber cells. *Plant Physiology* 91:217-220
- Klosgen, R.B., Gierl, A., Schwartz-Sommer, Z. and Saedler, H. (1986) Molecular analysis of the waxy locus of *Zea mays*. *Molecular and General Genetics* 203:237-244

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- Krishnan, H., Reeves, C.D. and Okita, T.W. (1986) ADPglucose pyrophosphorylase is encoded by different mRNA transcripts in leaf and endosperm of cereals. *Plant Physiology* 81:642-645
- Kumar, A., Tanaka, T., Lee, Y.M. and Preiss, J. (1988) Use of site-directed mutagenesis to probe the role of tyrosine 114 in the catalytic mechanism of ADPglucose synthetase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 263:14634-14639
- Kumar, A., Ghosh, P., Hill, M.A. and Preiss, J. (1989) Biosynthesis of bacterial glycogen: determination of the amino acid changes that alter the regulatory properties of a mutant *Escherichia coli* ADP-glucose synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 264:10464-10471
- Larson, C.E., Lee, Y.M. and Preiss, J. (1986) Covalent modification of the inhibitor-binding site(s) of *Escherichia coli* ADP-glucose synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 261:15402-15409
- Y.M., Kumar, A. and Preiss, J. (1987) Amino acid sequence of an *Escherichia coli* ADPglucose synthetase allosteric mutant as deduced from the DNA sequence of the *glgC* gene. *Nucleic Acids Research* 15:10603
- Lin, T., Caspar, T., Somerville, C.R. and Preiss, J. (1988a) Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiology* 86:1131-1135
- Lin, T., Caspar, T., Somerville, C.R. and Preiss, J. (1988b) A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADPglucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant Physiology* 88:1175-1181
- Liu, T.T. and Shannon, J.C. (1981) Measurement of metabolites associated with nonaqueous isolated starch granules from immature *Zea mays* L. endosperm. *Plant Physiology* 67:525-529
- Lucas, W.J. and Madore, M.A. (1988) Recent advances in sugar transport in: Preiss, J. (ed) *The Biochemistry of Plants*, Vol. 1, Academic Press, Inc., San Diego, pp. 35-84
- MacDonald, F.D. and ap Rees, T. (1983) Enzymatic properties of amyloplasts from suspension cultures of soybean. *Biochimica et Biophysica Acta* 755:81-89
- Mohabir, G. and John, P. (1988) Effect of temperature on starch synthesis in potato tuber tissue and in amyloplasts. *Plant Physiology* 88:1222-1228
- Morell, M., Bloom, M., Larsen, R., Okita, T.W. and Preiss, J. (1987a) Biochemistry and molecular biology of starch synthesis. In: McIntosh, L. and Keys, J. (eds) *Plant Gene Systems and their Biology. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, New Series, Vol. 62:227-242. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Morell, M., Bloom, M., Knowles, V. and Preiss, J. (1987b) Subunit structure of spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* 85:182-187
- Morell, M., Bloom, M. and Preiss, J. (1988) Affinity labeling of the allosteric activator site(s) of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* 263:633-637
- Ngernprasitsiri, J., Takabe, T. and Akazawa, T. (1989) Immunochemical analysis shows that an ATP/ADP-translocator is associated with the inner-envelope membranes from *Acer pseudoplatanus* L. *Plant Physiology* 89:1024-1027
- O'Farrell, P. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250:4007-4021
- Oliver, M.R., Ellis, R.J. and Schuch W.W. (1989) Isolation and nucleotide sequences of cDNA clones encoding ADP-glucose pyrophosphorylase polypeptides from wheat leaf endosperm. *Plant Molecular Biology* 12:525-538
- Okita, T.W., Greenberg, E., Kuhn, D.N. and Preiss, J. (1979) Subcellular localization of the starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaves. *Plant Physiology* 64:187-192
- Parsons, T.F. and Preiss, J. (1978) Biosynthesis of bacterial glycogen: isolation and characterization of the pyridoxal-P allosteric activator site and the ADP-glucose-protected pyridoxal-P binding site of *Escherichia coli* B ADP-glucose synthase. *Journal of Biological Chemistry* 253:7638-7645
- Preiss, J. (1978) Regulation of ADPglucose pyrophosphorylase. In: Meister, A. (ed). *Advances in Enzymology and Related areas of Molecular Biology*, Vol. 46, John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 317-381
- Preiss, J. (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annual Review Plant Physiology* 33:419-458
- Preiss, J. (1984) Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annual Review of Microbiology* 38:419-458
- Preiss, J. (1988) Biosynthesis of starch and its regulation. In: Preiss, J. (ed) *The Biochemistry of Plants*, Vol. 14, Academic Press, Inc., San Diego, pp. 181-254
- Preiss, J., Cress, D., Hutny, J., Morell, M., Bloom, M., Okita, T. and Anderson, J. (1989a) Regulation of starch synthesis: biochemical and genetic studies. In: Whitaker, J.R. and Sonnet, P.E. (eds), *ACS Symposium Series 389 on Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 84-92
- Preiss, J., Danner, S., Summers, P.S., Morell, M., Barton, C.R., Yang, L. and Neider, M. (1989b) Molecular characterization of the *Brittle-2* gene effect on maize endosperm ADPglucose pyrophosphorylase subunits. *Plant Physiology*, in press
- Preiss, J., MacDonald, F.D., Singh, B.N., Robinson, N., McNamara, K. (1985) Various aspects of the regulation of starch biosynthesis. In: Hill, R.D. and Munck, L. (eds), *New Approaches to Research in Cereal Carbohydrates Bulletin*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 1-17

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Sowokinos, J.R. and Preiss, J. (1982) Pyrophosphorylase on *Solanum tuberosum*.

III. Purification, physical, and catalytic properties of ADPglucose  
pyrophosphorylase in potatoes. *Plant Physiology* 69:1459-1466

Steup, M., Peavey, D.G. and Gibbs, M. (1976) The regulation of starch  
metabolism by inorganic phosphate. *Biochemistry and Biophysics*  
*Research Communication* 72:1554-1561

Sung, S.S., Xu, D.-P. and Black, C.C. (1989) Identification of actively filling sucrose  
sinks. *Plant Physiology* 89:1117-1121

Tyson, R.H. and ap Rees, T. (1988) Starch synthesis by isolated amyloplasts from  
wheat endosperm. *Planta* 175:33-38

Verr, W., Frommer, W.-B., Maas, C. and Starlinger, P. (1985) Structure of the  
sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. *EMBO Journal*  
4:1373-1380

# Chapter 13

## Strategies for Potato Transformation and Regeneration

D.H. Mitten, M. Horn, M.M. Burrell and K.S. Blundy

Since 1983, when Fraley and co-workers reported the successful recovery of transformed shoots from tobacco and petunia plants, there has been an explosion of reports detailing the transfer of various foreign genes into an ever growing list of plant species (see reviews by Klee et al., 1987; and Weising et al., 1988). First among these were species that were readily regenerable from a tissue amenable to infection by *Agrobacterium*. Species that were more difficult to regenerate but still susceptible to *Agrobacterium* infection were next. In the last few years species not susceptible to *Agrobacterium* infection, for example, species in the Gramineae, have been transformed as alternative gene transfer techniques, such as direct gene transfer and microbombardment, have been developed (Shillito et al., 1985; Fillatti et al., 1987; Horn et al., 1988).

### Potato Transformation

The first reports of transformed potato plants were from *in vitro* shoots of a tetraploid potato (cv. Maris Bard) infected with an oncogenic strain of *Agrobacterium tumefaciens* (Ooms et al., 1983). Shoots which appeared on the resultant galls after 2-4 months, were excised and analyzed for opine production. Clones which produced opines could not root, strongly suggesting that these shoots contained the complete T-DNA sequence since this encodes genes for opine synthesis and the plant growth regulators, IAA and cytokinin. Direct evidence of potato transformation was obtained by Ooms et al (1986) when cv. Desiree clones regenerated from *Agrobacterium rhizogenes* infected tissue were analyzed by Northern blotting. About this time An and co-workers reported their binary *Ti* plasmid vector system (1986) which was used to transform tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, and potato. The NPT II gene, conferring resistance to the antibiotic Kanamycin, had become widely available by 1986 and is still the genetic marker of choice for transformation in many laboratories.

An informal survey of the laboratories represented at the First International Symposium on the Molecular Biology of the Potato showed that most use *Agrobacterium tumefaciens* although some investigators employ the *Agrobacterium rhizogenes* vectors created by the International Potato Center (CIP). A disadvantage of the *Agrobacterium rhizogenes*-based transformation systems is that positive transformants produce hairy roots induced by the *Ri* plasmid genes (Hanisch ten Cate, et al., 1987), which must be callused and then

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## REPORTS

18. S. J. Mansour, J. M. Candia, J. E. Matsuura, M. C. Manning, N. G. Ahn, *Biochemistry* **35**, 15529 (1996).
19. The microtubule nucleation assay was done essentially as described [T. Stearns and M. Kirschner, *Cell* **76**, 623 (1994)]. Briefly, rhodamine-labeled bovine tubulin (from T. Stearns, Stanford University) and *Xenopus* sperm were added to extracts to yield final concentrations of 120  $\mu$ g/ml and 200 nuclei per microliter, respectively. Extracts were incubated at room temperature for 10 min. Samples were diluted in 9 vol of glutaraldehyde (0.25%), centrifuged through a 25% glycerol cushion onto coverslips, and stained with DAPI. The DAPI-stained sperm and rhodamine-labeled tubulin were examined by fluorescence microscopy.
20. Addition of purified *Xenopus* or rat MAPK to interphase extracts can be sufficient to produce mitotic-like microtubules under some circumstances [Y. Gotoh et al., *Nature* **349**, 251 (1991)]. One difference between their experiment and ours is the way the interphase extracts were prepared. We used cycloheximide-soaked eggs, and prepared the interphase extracts in cycloheximide-containing buffers, which prevents cyclin synthesis (17). Apparently they prepared interphase extracts in the absence of cycloheximide, and as a result their extracts may have contained substantial amounts of cyclins. The mitotic-like microtubules they observed therefore may have resulted from a combination of MAPK and Cdc2-cyclin activities.
21. N. Furuno et al., *EMBO J.* **13**, 2399 (1994).
22. M. H. Verhac et al., *Development* **122**, 815 (1996).
23. Supported by a grant from the National Institutes of Health (GM46383). We thank T. Stearns for providing rhodamine-labeled tubulin and for advice; N. Ahn for providing MEK plasmids and for sharing unpublished data; G. Gorbsky and M. Weber for sharing unpublished data; M. Murakami and G. Vande Woude for providing Mos plasmids; and K. Cimprich and members of the Ferrell laboratory for comments on the manuscript. T.M.G. is a Special Fellow of the Leukemia Society of America. J.E.F. is a Howard Hughes Junior Faculty Scholar.

6 July 1998; accepted 14 October 1998

## Catalytic Plasticity of Fatty Acid Modification Enzymes Underlying Chemical Diversity of Plant Lipids

Pierre Broun,\* John Shanklin,\*† Ed Whittle, Chris Somerville†

Higher plants exhibit extensive diversity in the composition of seed storage fatty acids. This is largely due to the presence of various combinations of double or triple bonds and hydroxyl or epoxy groups, which are synthesized by a family of structurally similar enzymes. As few as four amino acid substitutions can convert an oleate 12-desaturase to a hydroxylase and as few as six result in conversion of a hydroxylase to a desaturase. These results illustrate how catalytic plasticity of these diiron enzymes has contributed to the evolution of the chemical diversity found in higher plants.

All higher plants contain one or more oleate desaturases that catalyze the  $O_2$ -dependent insertion of a double bond between carbons 12 and 13 of lipid-linked oleic acid (18:1<sup>Δ9</sup>) to produce linoleic acid (18:2<sup>Δ9,12</sup>) (1). In contrast, only 14 species in 10 plant families have been found to accumulate the structurally related hydroxy fatty acid, ricinoleic acid (D-12-hydroxyoctadec-*cis*-9-enoic acid) (2), which is synthesized by an oleate hydroxylase that exhibits a high degree of sequence similarity to oleate desaturases (3). The oleate desaturases and hydroxylases are integral membrane proteins, which are members of a large family of functionally diverse enzymes that includes alkane hydroxylase, xylene monooxygenase, carotene ketolase, and sterol methylxidase (1). These nonheme iron-containing enzymes use a diiron cluster for catalysis (4) and contain three equivalent histidine clusters that have been implicated in iron binding and shown to be essential for catalysis (1). This class of proteins exhibits no significant sequence identity to the

soluble diiron-containing enzymes which represent a similar diversity of enzymatic activities that include plant acyl-ACP desaturases, methane monooxygenase, propene monooxygenase, and the R2 component of ribonucleotide reductase (1, 5). The catalytic activities of these enzymes has been mimicked by a synthetic diiron-containing complex with a coordination sphere composed entirely of nitrogen ligands (6).

The oleate hydroxylase from the crucifer *Lesquerella fendleri* has about 81% sequence identity to the oleate desaturase from the crucifer *Arabidopsis thaliana* and about 71% sequence identity to the oleate hydroxylase from *Ricinus communis* (7). The observation that these crucifer desaturase and hydroxylase enzymes are more similar than the two hydroxylases, and the presence of ricinoleic acid in a small number of distantly related plant species, suggests that the capacity to synthesize ricinoleate has arisen independently several times during the evolution of higher plants, by the genetic conversion of desaturases to hydroxylases.

Comparison of the amino acid sequences of the hydroxylases from *L. fendleri* and *R. communis* with the sequences for oleate desaturases from *Arabidopsis*, *Zea mays*, *Glycine max* (two sequences), *R. communis*, and *Brassica napus* revealed that only seven residues were strictly

conserved in all of the six desaturases but divergent in both of the hydroxylases. The role of these seven residues was assessed by using site-directed mutagenesis to replace the residues found in the *Lesquerella* hydroxylase, LFAH12, with those from the equivalent positions in the desaturases (8, 9). In a reciprocal experiment, we replaced the seven residues in the *Arabidopsis* FAD2 oleate desaturase with the corresponding *Lesquerella* hydroxylase residues (10). The activity of the modified and unmodified genes was then determined by expressing them in yeast and transgenic plants before analyzing the composition of the total fatty acids. Technical difficulties limited the utility of direct measurements of enzyme activity in cell extracts (11).

The mutant hydroxylase and desaturase genes containing all seven substitutions (designated m7LFAH12 and m7FAD2, respectively) were expressed in yeast cells under transcriptional control of the GAL1 promoter. Transgenic cells were harvested after induction and their total fatty acid composition determined by gas chromatography. Wild-type yeast cells do not accumulate detectable concentrations of diunsaturated or hydroxylated fatty acids (12). Expression of FAD2 caused the accumulation of about 4% diunsaturated fatty acids (16:2 and

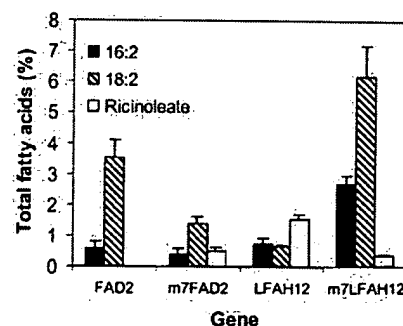


Fig. 1. Fatty acid composition of yeast cells expressing desaturase and hydroxylase genes. Cultures were induced in growth medium containing galactose,  $\sim 2 \times 10^8$  cells were harvested, and fatty acids were extracted and modified for analysis by gas chromatography, as described (7). Values are the averages ( $\pm$ SE) obtained from five cultures of independent transformants.

P. Broun and C. Somerville, Carnegie Institution of Washington, Department of Plant Biology, 260 Panama Street, Stanford, CA 94305, USA. J. Shanklin and E. Whittle, Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY 11973, USA.

\*These authors contributed equally to this work.

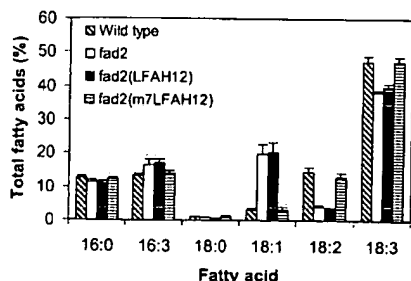
†To whom correspondence should be addressed.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

18:2) but no detectable hydroxy fatty acids (Fig. 1). Expression of LFAH12 caused the accumulation of about 1.4% diunsaturated fatty acids and 1.5% ricinoleic acid, confirming the mixed function of this enzyme (7). Cells expressing  $m_7$ FAD2 accumulated ricinoleic acid to ~0.5% of total fatty acids and had ~50% reduction in the accumulation of diunsaturated fatty acids (Fig. 1). Thus, replacement of the seven residues (10) converted a strict desaturase to a bifunctional desaturase-hydroxylase comparable in activity to the unmodified *Lesquerella* hydroxylase.

The amount of desaturase activity of the LFAH12 enzyme is relatively low compared with its hydroxylase activity (7). However, yeast cells expressing LFAH12 accumulated linoleic and ricinoleic acids to similar concentrations, possibly because linoleic acid is more stable than ricinoleic acid in yeast cells. In cells expressing  $m_7$ LFAH12, the ratio of 18:2 diunsaturated fatty acid to ricinoleic acid was, on average, 43 times that in cells expressing LFAH12. There was also a 16-fold increase in the ratio of 16:2 diunsaturated fatty acid to ricinoleic acid. Notwithstanding the quantitative limitations of the assay system, noted above, these results indicate a major increase in desaturase activity and a decrease in hydroxylase activity upon introduction of the seven desaturase-equivalent residues into LFAH12.

The activity of the mutant enzymes in planta was examined by using the corresponding genes to produce stable transgenic plants in an *Arabidopsis fad2* mutant, which is deficient in oleate desaturase activity (13). Expression of LFAH12 under transcriptional control of the constitutive cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter resulted in accumulation of high concentrations of hydroxy fatty acids in seeds (7), but no detectable suppression of the *fad2* mutant phenotype in leaves (Fig. 2). In contrast, expression of  $m_7$ LFAH12 under the same circumstances resulted in complete suppression of the *fad2* phe-

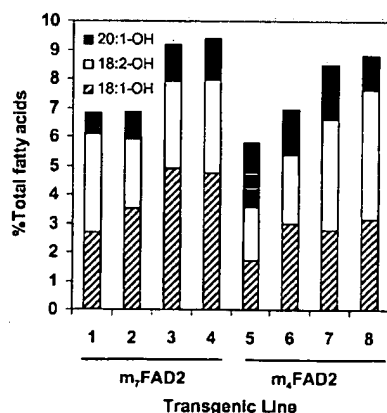


**Fig. 2.** Genetic complementation of the *Arabidopsis fad2* mutation with the  $m_7$ LFAH12 gene. Measurements were made of the fatty acid composition of leaf lipids from wild-type, the *fad2* mutant, and transgenic *fad2* plants expressing LFAH12 or  $m_7$ LFAH12, under the control of the CaMV 35S promoter. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

notype in 8 out of 10 transgenic plants analyzed (Fig. 2). There was an average 21-fold increase in the ratio of linoleate to oleate in leaf fatty acids and a small increase in the amount of linolenic acid. These results, which are consistent with the results of the yeast assays, confirm that expression of  $m_7$ LFAH12 in plants deficient in oleate desaturation has identical phenotypic consequences to expressing a wild-type desaturase such as FAD2 (13).

To evaluate the effect of the seven mutations on the activity of the gene encoding FAD2, we expressed FAD2 and  $m_7$ FAD2 in the *Arabidopsis fad2* mutant under the control of the strong seed-specific promoter from the *B. rapa* napin gene. As expected from previous studies (7), none of the 15 transgenic lines expressing the FAD2 gene accumulated detectable hydroxy fatty acids, although the ratio of linoleate to oleate accumulation was increased an average of 10-fold as compared with untransformed controls. In the transgenic lines expressing  $m_7$ FAD2, the amount of hydroxylated fatty acids, which included ricinoleic, densipolic, and lesquerolic acids, composed up to 9.4% of total seed fatty acids (Fig. 3). The ratio of seed linoleate to oleate contents was increased an average of 6.4-fold (14), which indicated that  $m_7$ FAD2 exhibited significant desaturase activity, albeit less than the wild-type FAD2 gene. The high concentrations of hydroxy fatty acid accumulation observed in transgenic plants expressing  $m_7$ FAD2 indicated that the modified desaturase had comparable levels of hydroxylase activity, in the in planta assay, to the native *Lesquerella* hydroxylase enzyme.

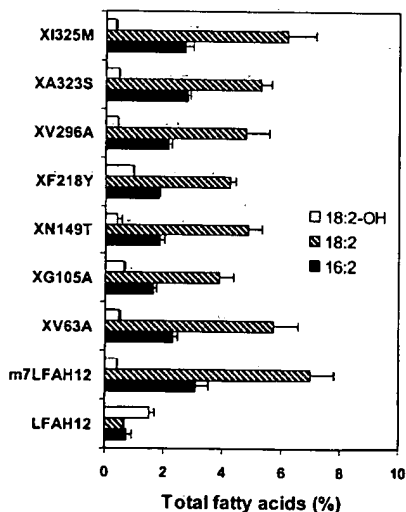
To determine whether any single amino acid residue of the seven had a major effect on the ratio of hydroxylase to desaturase activities, we introduced each of the seven FAD2-equivalent residues (8) individually into the LFAH12 en-



**Fig. 3.** Fatty acid content of seed lipids from independent transgenic *Arabidopsis* lines expressing  $m_7$ FAD2 or  $m_7$ FAD2 under control of the *B. napus* napin promoter. Abbreviations: ricinoleic acid (18:1-OH), densipolic acid (18:2-OH), and lesquerolic acid (20:1-OH).

zyme. None of the enzymes containing single amino acid substitutions had activities that differed significantly from the wild-type hydroxylase enzyme when expressed in yeast (14). We also tested seven modified LFAH12 genes containing all combinations of six desaturase-equivalent residues (Fig. 4). Each of the seven constructs produced a ratio of diunsaturated to hydroxylated fatty acids that was similar to the ratio produced by the  $m_7$ LFAH12 enzyme. Thus, as few as six residues principally determine the ratio of desaturation or hydroxylation activity. All lines showed somewhat reduced levels of desaturase activity, with the largest reductions of ~40% seen in F218Y and G105A. Therefore, we made a construct in which both these changes were combined (xF218Y/G105A). This construct exhibited similar activity to the individual F218Y and G105A mutants (14), suggesting that their effects are redundant and that the observed changes in activity result from interactions of more than two of the seven residues. Considered together, these results indicate that no single amino acid position plays an essential role in catalytic outcome. Rather, changes in activity result from a combined effect of several amino acid positions that have partially overlapping effects.

Because four of the seven amino acids are adjacent to histidine residues that have been identified as essential to catalysis (1), we hypothesized that these four residues may be of greatest importance to the outcome of the reaction. A modified FAD2 enzyme, designated  $m_4$ FAD2, was constructed in which these four amino acids



**Fig. 4.** Contribution of individual amino acid substitutions to the activity of the modified *Lesquerella* hydroxylase. Seven derivatives of the  $m_7$ LFAH12 gene containing all combinations of six out of seven substitutions were introduced into yeast cells, and the fatty acid composition of five independent cultures was measured. The "X" designation refers to the unmodified amino acid (that is, enzyme XI325M contains all of the seven substitutions except I325M).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## REPORTS

were replaced by their equivalents from the *Lesquerella* hydroxylase (T148N, A296V, S322A, M324I). Expression of m<sub>7</sub>FAD2 in seeds of wild-type *Arabidopsis* resulted in the accumulation of average concentrations of hydroxy fatty acids that were similar to those obtained with m<sub>7</sub>FAD2 (Fig. 3). Thus, only four changes are required to convert a strict desaturase to an enzyme that retains some desaturase activity but is also an efficient hydroxylase.

Biochemical and structural similarities between the desaturase and hydroxylase, in addition to recent kinetic isotope experiments, suggest that there is a common initial oxidation event at C-12 for both enzymes (15). Thus, it seems likely that the different functional outcomes represent a partitioning between two reaction pathways that diverge after initial C-12 hydrogen abstraction such that one pathway favors a second hydrogen abstraction whereas the other favors oxygen transfer. We envision that because no specific single amino acid change is required, and in view of the substantial effect of the four residues that abut the active site histidines, the differences between desaturase and hydroxylase outcome is influenced by changes in active site geometry. Examples of such changes might include the relative positioning of the substrate with respect to the iron center, the coordination geometry of the iron ions, or the active site hydrogen bonding network. Whatever the case, this mode of evolving new catalytic activity differs from the more general case in which the evolution of new activities involves the incorporation of new catalytic groups into the active site (16).

Acetylenic and epoxy fatty acids are produced by desaturation and epoxidation of double bonds by enzymes that are structurally similar to the enzymes described here (17). Thus, variations of the same catalytic center can catalyze the formation of at least four different functional groups in fatty acids. Because various combinations of these four functional groups define most of the chemical complexity found among the hundreds of different fatty acids that occur in higher plants (2), it is now apparent that most of the chemical complexity of plant fatty acids can be accounted for by divergence of a small number of desaturases. Extrapolating from the results described here, it also seems very likely that a small number of amino acid substitutions will account for the functional divergence of desaturases, hydroxylases, epoxigenases, and acetylenic bond-forming enzymes.

### References and Notes

1. J. Shanklin and E. B. Cahoon, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 611 (1998).
2. F. N. van de Loo, B. Fox, C. R. Somerville, in *Plant Lipids*, T. Moore, Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL, 1993), pp. 91-126.
3. R. A. Moreau and P. K. Stumpf, *Plant Physiol.* **67**, 672 (1981); F. N. van de Loo, P. Broun, S. Turner, C. R. Somerville, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 6743 (1995).

4. J. Shanklin, C. Achim, H. Schmidt, B. G. Fox, E. Münck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 2981 (1997).
5. L. Que Jr., *Science* **253**, 273 (1991); J. Shanklin and C. R. Somerville, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 2510 (1991); M. Suzuki, T. Hayakawa, J. P. Shaw, M. Reik, S. Harayama, *J. Bacteriol.* **173**, 1690 (1991); Y. Lindqvist, W. Huang, G. Schneider, J. Shanklin, *EMBO J.* **15**, 4081 (1996); J. D. Pikus et al., *Biochemistry* **35**, 9106 (1996).
6. C. Kim, Y. Dong, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3635 (1997).
7. P. Broun, S. Boddupalli, C. R. Somerville, *Plant J.* **13**, 201 (1998).
8. The seven mutations were V63A, G105A, N149T, F218Y, V296A, A323S, and I325M numbered relative to the LFAH12 sequence, where the first residue at the indicated position was mutated to the second residue. Single-letter abbreviations for the amino acid residues are as follows: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; and Y, Tyr.
9. Mutagenic oligonucleotides were used to introduce nucleotide substitutions into cloned genes by overlap-extension polymerase chain reaction (PCR) [W. Ito, H. Ishiguro, Y. Kurosawa, *Gene* **102**, 67 (1991)]. In a first step, we amplified overlapping fragments in separate PCR reactions using primer pairs designed to introduce mutations. The products were gel purified, then assembled in a PCR reaction primed with terminal primers only. Modified LFAH12 genes containing one or seven substitutions were constructed with pLFAH12-1 as template (7) and primers mH1 through mH5 or mH67. Modified LFAH12 genes containing only six mutations were constructed with m<sub>7</sub>LFAH12 as a template and one of the primers H1 to H7 to revert one of the mutations. The 5' end of terminal primers was modified to allow the introduction of convenient restriction sites for the cloning of PCR products. The m<sub>7</sub>FAD2 was constructed with oligonucleotides D1 to D5 and D67. The PCR conditions were as follows: 10 ng of plasmid DNA, 200 μM deoxynucleotide triphosphates, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% (v/v) Triton X-100, bovine serum albumin (1000 μg/ml), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% (v/v) dimethyl sulfoxide, 125 pmol of each primer, 1.25 U of Pfu polymerase (Stratagene), to a final volume of 50 μl. Amplification conditions were as follows: 4 min denaturation step at 94°C, followed by 30 cycles of 92°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 2 min, concluded with a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were purified from agarose or polyacrylamide gels. For the second PCR step, 10 ng of purified overlapping fragments were used as templates in PCR reactions as above except that only 15 cycles were used. PCR fragments encoding modified LFAH12 enzymes were cloned into pLFAH12-1 cut with Pst I and one of Sma I or Eco RV or Sac I. All inserts were sequenced. Yeast expression vectors containing wild-type or modified LFAH12 genes were constructed by excising inserts from the above constructs with the enzymes Hind III and Sac I and cloning them into the Hind III-Sac I sites of pYESII (Invitrogen). Constructs for plant transformation were made by cloning the Stu I-Sac I fragment from modified LFAH12 genes into the Sma I-Sac I sites of pBI121. The FAD2 cDNA clone 146M1277 was amplified with Pfu DNA polymerase by using primers D5' and D3' to introduce restriction sites for Kpn I and Sma I immediately upstream of the initiation codon, and Sac I and Eco RI restriction sites following the terminator codon. The fragment was cloned into the Eco RV site in the vector pZEO (Invitrogen). For expression of FAD2 in yeast, the insert was excised by restriction with Kpn I and Eco RI and cloned into the corresponding sites in pYESII, resulting in plasmid pYESII-F2. Binary Ti-vector pDN was constructed for seed-specific expression of FAD2 genes. In a first step, the napin promoter was amplified from rapeseed DNA with primers ggcgtgcagaagctcttgcggaacagcagctttca and gggtttgagtagtgatctgttctgtagtctgtaggtaccgtac. A Hind III-Bgl II fragment was cloned into the Hind III-Bgl II sites of pBI121 (Clontech), replacing the 35S promoter. FAD2 coding sequences were excised from pYESII-F2 with Sma I and Sac I and cloned

into pDN with corresponding restriction sites. The construction of the m<sub>7</sub>FAD2 cDNA encoding a modified FAD2 enzyme containing seven amino acid substitutions was achieved with overlap extension PCR. After the second round of assembly-amplification with the primers D5' and D3', the PCR products were treated exactly as the amplified wild-type FAD2 sequence described above.

Plant expression constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 pMP90 by electroporation and used to transform *Arabidopsis fad2* mutant plants by vacuum infiltration [D. Bouchez, C. Camilleri, M. Caboche, C. R. Acad. Sci. Ser. Iii **316**, 1188 (1993)]. The oligonucleotides used were mH1f atcattcttagctcttctgctct, mH1r agaagcaagaagctaaagtgtat, mH2f ctggcgattgcccataagtggtggtcacc, mH2r ggtgaccacattcatggcgaatgaccag, mH3f caccattcaacactggatctctagaa, mH3r ttctaggatgccagtgttggaatggtg, mH4f catgcacattctataagggaccgtg, mH4r cagcgtctctatagataggtgcatg, mH5f agaggagctgttgctacgtgtagac, mH5r gtctaccgtgacaaagctctct, mH67f catctcttttcaactatgccgcat, mH67r atgcgcagcatgtgaaagaagagatg, mH6f catctcttttcaactatgccgcat, mH6r atgcgcagcatgtgaaagaagagatg, mH7f catctcttttcaactatgccgcat, mH7r atgcgcagcatgtgaaagaagagatg, mH1f atcattcttagctcttctgctct, mH1r agaagcaagaagctaaagtgtat, mH2f ctggcgattgcccataagtggtggtcacc, mH2r ggtgaccacattcatggcgaatgaccag, mH3f caccattcaacactggatctctagaa, mH3r ttctaggatgccagtgttggaatggtg, mH4f catgcacattctataagggaccgtg, mH4r cagcgtctctataagggaccgtg, mH5f agaggagctgttgctacgtgtagac, mH5r gtctaccgtgacaaagctctct, mH6f catctcttttcaactatgccgcat, mH6r atgcgcagcatgtgaaagaagagatg, mH7f catctcttttcaactatgccgcat, mH7r atgcgcagcatgtgaaagaagagatg, mD1f gacatcattatagctctatgctctact, mD1r agtagaagcagagactataatgatgctc, mD2f ctgggtcatagggccagcaatgctgctc, mD2r gaccgattctggtgctatgaccag, mD3f caccattcaacaaatggatccctcgaa, mD3r ttccgggagcattctgttggaatggtg, mD4f ccccaagctctccatcttcaatgaccag, mD4r ttctcggtcattgaagatgggagcgttgggg, mD5f caggggagctgttggtaccgtgacagag, mD5r ctctgtctacgtgaacaaagctccctc, mD67f caccgtgttcgcgaataccgattataaccg, mD67r gcgttataatgcggtatgtgcggaacaggtg, mH5' tatcgaagcctgatgggtgct, mH3' ctgcagctatgcagctcataactattgtt, D5' gatcgtgaccgggaggtgaggtgaggaagaatgcgg, and D3' gatcgaatgcagctctcataactattgttaccagctacacac. The bold and underline letters indicate altered nucleotides and codons, respectively.

10. The seven mutations were A63V, A104G, T148N, Y217F, A295V, S322A, and M324I, designated on the basis of the numbering of the *Arabidopsis* FAD2 sequence.
11. The enzymes are integral membrane proteins that act on fatty acids esterified to lipids and require cytochrome b<sub>5</sub> reductase and cytochrome b<sub>5</sub> for activity. The difficulty of quantitatively incorporating labeled lipids into isolated membranes and ensuring that cytochrome b<sub>5</sub> and b<sub>5</sub> reductase are not limiting, restricts the utility of direct measurements of enzyme activity. Our best estimates of oleate desaturase or oleate hydroxylase activities in crude microsomal preparations from *Arabidopsis* roots indicated specific activities of 1.2 and 0.3 pmol/mg of protein per minute, respectively.
12. P. S. Covello and D. W. Reed, *Plant Physiol.* **111**, 223 (1996); S. Kajiwara et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4309 (1996).
13. M. Miquel and J. Browse, *J. Biol. Chem.* **267**, 1502 (1992).
14. P. Broun et al., data not shown.
15. P. H. Buist and B. Behrouzian, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 871 (1998).
16. P. C. Babbitt and J. A. Gert, *J. Biol. Chem.* **272**, 30591 (1997).
17. M. Lee et al., *Science* **280**, 915 (1998).
18. We thank S. Stymme for communicating results before publication, and B. Behrouzian for helpful discussion. This work was supported in part by grants from the U.S. Department of Energy Office of Basic Energy Sciences to C.R.S. (DE-FG02-97ER20133), and to J.S. and E.J.W. The Monsanto Company awarded P.B. a fellowship.

31 July 1998; accepted 9 October 1998

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Q2

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/82, C07K 14/415, A01H 5/00, C12N 15/29</b>		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/58654</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03292		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)	
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Mai 1999 (12.05.99)		(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).	
(30) Prioritätsdaten: 198 21 442.1 13. Mai 1998 (13.05.98) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PLANT-TEC BIOTECHNOLOGIE GMBH FORSCHUNG & ENTWICKLUNG [DE/DE]; Hermannswerder 14, D-14473 Potsdam (DE). MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE).		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEUHAUS, Ekkehard [DE/DE]; Sachsenweg 29, D-49086 Osnabrück (DE). MOEHLMANN, Torsten [DE/DE]; Gellertstrasse 17, D-32257 Bünde (DE). GRAEVE-KAMPFENKEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Im Sempel 10A, D-55246 Mainz-Kostheim (DE). TJADEN, Joachim [DE/DE]; Johannisstrasse 97, D-49074 Osnabrück (DE). SCHELL, Jozef [DE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE). MARTINI, Norbert [DE/DE]; Herbigstrasse 3g, D-50825 Köln (DE).			
(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 9. März 2000 (09.03.00)			
(54) Title: TRANSGENIC PLANTS WITH A MODIFIED ACTIVITY OF A PLASTIDIAL ADP/ATP TRANSLOCATOR			
(54) Bezeichnung: TRANSGENE PFLANZEN MIT VERÄNDERTER AKTIVITÄT EINES PLASTIDÄREN ADP/ATP - TRANSLOKATORS			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to transgenic plant cells and plants which, compared to wild type cells or plants, exhibit an increased yield, especially an increased oil and/or starch content, and which preferably synthesize a modified starch. The described plants exhibit an increase or a decrease of the plastidial ADP/ATP translocator activity.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen beschrieben, die im Vergleich zu Wildtypzellen bzw. -pflanzen einen erhöhten Ertrag, insbesondere einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt aufweisen und vorzugsweise eine modifizierte Stärke synthetisieren. Die beschriebenen Pflanzen zeigen eine Erhöhung bzw. eine Verringerung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/EP 99/03292

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C07K14/415 A01H5/00 C12N15/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NEUHAUS H E ET AL.: "Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of Arabidopsis thaliana L." PLANT JOURNAL, vol. 11, no. 1, 1997, pages 73-82, XP002126932 ISSN: 0960-7412 cited in the application siehe besonders Seite 7 Absatz 2 the whole document	1-16
A	WO 94 10320 A (MOGEN INT ; SIJMONS PETER CHRISTIAAN (NL); GODDIJN OSCAR JOHANNES M) 11 May 1994 (1994-05-11) the whole document --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 January 2000

Date of mailing of the international search report

24/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. onal Application No

PCT/EP 99/03292

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MÖHLMANN T ET AL.: "Occurrence of two plastidic ATP/ADP transporters in Arabidopsis thaliana L"            EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,            vol. 252, no. 3, March 1998 (1998-03),            pages 353-359, XP000865628            ISSN: 0014-2956            the whole document</p>	
A	<p>EMMERMANN M ET AL.: "The ADP/ATP translocator from potato has a long amino-terminal extension"            CURRENT BIOLOGY,            vol. 20, no. 5, November 1991 (1991-11),            pages 405-410, XP000863257            the whole document</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03292

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9410320 A	11-05-1994	AU 5420594 A	24-05-1994
		CA 2148451 A	11-05-1994
		EP 0666922 A	16-08-1995
-----			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03292

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C07K14/415 A01H5/00 C12N15/29

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NEUHAUS H E ET AL.: "Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of Arabidopsis thaliana L." PLANT JOURNAL, Bd. 11, Nr. 1, 1997, Seiten 73-82, XP002126932 ISSN: 0960-7412 in der Anmeldung erwähnt siehe besonders Seite 7 Absatz 2 das ganze Dokument	1-16
A	WO 94 10320 A (MOGEN INT ;SIJMONS PETER CHRISTIAAN (NL); GODDIJN OSCAR JOHANNES M) 11. Mai 1994 (1994-05-11) das ganze Dokument	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Januar 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, T.x. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03292

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie:	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>MÖHLMANN T ET AL.: "Occurence of two plastidic ATP/ADP transporters in Arabidopsis thaliana L"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 252, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 353-359, XP000865628 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>EMMERMANN M ET AL.: "The ADP/ATP translocator from potato has a long amino-terminal extension"</p> <p>CURRENT BIOLOGY, Bd. 20, Nr. 5, November 1991 (1991-11), Seiten 405-410, XP000863257 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03292

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9410320 A	11-05-1994	AU 5420594 A	24-05-1994
		CA 2148451 A	11-05-1994
		EP 0666922 A	16-08-1995
<hr/>			

**THIS PAGE BLANK** (USPTO



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/00</b>		<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/58654</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/03292</b>		(74) Anwalt: <b>VOSSIUS &amp; PARTNER</b> ; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Mai 1999 (12.05.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 21 442.1 13. Mai 1998 (13.05.98) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, <b>US</b> , UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>PLANT-TEC BIOTECHNOLOGIE GMBH FORSCHUNG &amp; ENTWICKLUNG [DE/DE]; Hermannswerder 14, D-14473 Potsdam (DE). MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE).</b>		<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>NEUHAUS, Ekkehard [DE/DE]; Sachsenweg 29, D-49086 Osnabrück (DE). MOEHLMANN, Torsten [DE/DE]; Gellertstrasse 17, D-32257 Bünde (DE). GRAEVE-KAMPFENKEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Im Sempel 10A, D-55246 Mainz-Kostheim (DE). TJADEN, Joachim [DE/DE]; Johannisstrasse 97, D-49074 Osnabrück (DE). SCHELL, Jozef [DE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE). MARTINI, Norbert [DE/DE]; Herbigstrasse 3g, D-50825 Köln (DE).</b>			
(54) Title: <b>TRANSGENIC PLANTS WITH A MODIFIED ACTIVITY OF A PLASTIDIAL ADP/ATP TRANSLOCATOR</b>			
(54) Bezeichnung: <b>TRANSGENE PFLANZEN MIT VERÄNDERTER AKTIVITÄT EINES PLASTIDÄREN ADP/ATP - TRANSLOKATORS</b>			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to transgenic plant cells and plants which, compared to wild type cells or plants, exhibit an increased yield, especially an increased oil and/or starch content, and which preferably synthesize a modified starch. The described plants exhibit an increase or a decrease of the plastidial ADP/ATP translocator activity.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen beschrieben, die im Vergleich zu Wildtypzellen bzw. -pflanzen einen erhöhten Ertrag, insbesondere einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt aufweisen und vorzugsweise eine modifizierte Stärke synthetisieren. Die beschriebenen Pflanzen zeigen eine Erhöhung bzw. eine Verringerung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Transgene Pflanzen mit veränderter Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators**

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer erhöhten plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität. Derartige Zellen und Pflanzen weisen einen erhöhten Ertrag, vorzugsweise einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt auf und synthetisieren vorzugsweise eine Stärke mit erhöhtem Amylosegehalt.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer verringerten plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität. Derartige Zellen und Pflanzen synthetisieren eine Stärke mit verringertem Amylosegehalt.

Auf dem Gebiet der Agrar- und Forstwirtschaft ist man stetig darum bemüht, Pflanzen mit erhöhtem Ertrag zur Verfügung zu stellen, insbesondere um die Ernährung der fortwährend anwachsenden Weltbevölkerung sicherzustellen und die Versorgung mit nachwachsenden Rohstoffen zu gewährleisten. Traditionell wird versucht, ertragreiche Pflanzen durch Züchtung zu erhalten. Dieses ist jedoch zeit- und arbeitsintensiv. Ferner müssen entsprechende Züchtungsprogramme für jede interessierende Pflanzenart durchgeführt werden.

Fortschritte wurden zum Teil bereits durch die genetische Manipulation von Pflanzen erzielt, d.h. durch die gezielte Einführung und Expression von rekombinanten Nucleinsäuremolekülen in Pflanzen. Derartige Ansätze haben den Vorteil, daß sie in der Regel nicht auf eine Pflanzenart beschränkt sind, sondern sich auch auf andere Pflanzenarten übertragen lassen.

So wurde beispielsweise in EP-A 0 511 979 beschrieben, daß die Expression einer prokaryontischen Asparagin-Synthetase in Pflanzenzellen unter anderem zu einer erhöhten Biomasseproduktion führt. Die WO 96/21737 beschreibt z.B. die Ertragssteigerung in Pflanzen durch Expression von de- oder unregulierter Fructose-1,6-bisphosphatase, aufgrund der Erhöhung der Photosyntheserate. Trotzdem

besteht nach wie vor Bedarf an generell anwendbaren Verfahren zur Verbesserung des Ertrages bei land- oder forstwirtschaftlich interessanten Pflanzen.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist ferner eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen. Ferner ist es erforderlich, die Ausbeute an diesen pflanzlichen Inhaltsstoffen zu erhöhen, um die Effizienz der Produktion erneuerbarer Rohstoffquellen aus Pflanzen zu steigern.

Neben Fetten und Proteinen stellen Öle und Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Hierbei sind vor allem Kartoffel und Mais interessante Pflanzen, da sie für die Stärkeproduktion wichtige Kulturpflanzen darstellen.

Das Polysaccharid Stärke, das einen der wichtigsten Speicherstoffe im Pflanzenreich darstellt, findet neben der Verwendung im Nahrungsmittelbereich auch eine breite Verwendung als nachwachsender Rohstoff für die Herstellung industrieller Produkte.

Die Stärkeindustrie besitzt ein großes Interesse an Pflanzen mit erhöhtem Stärkegehalt, der in der Regel gleichbedeutend mit einem erhöhtem Trockengewicht ist. Ein erhöhtes Trockengewicht steigert den Wert der in der Stärkeindustrie verarbeiteten Pflanzen (Mais, Kartoffel, Tapioka, Weizen, Gerste, Reis etc.) wegen der höheren Ausbeute an Stärke. Zusätzlich bieten Pflanzenzellen oder pflanzliche Organe, die mehr Stärke enthalten, Vorteile bei der Weiterverarbeitung in der Nahrungsmittelindustrie, weil sie weniger Fett bzw. Frittieröl absorbieren und daher zu "gesünderen" Produkten mit reduziertem Kaloriengehalt führen. Diese Eigenschaft ist z. B. von großem Interesse bei der Herstellung von "Popcorn", "corn flakes" aus Mais oder von Pommes frites, Chips oder Kartoffelpuffer aus Kartoffeln.

Für die Kartoffelstärke verarbeitende Industrie stellt das Trockengewicht (Stärkegehalt) die entscheidende Größe dar, weil es die Prozessierungskosten bestimmt. Ein erhöhtes Trockengewicht (Stärkegehalt) bedeutet bei gleichbleibendem Ertrag, daß der Wassergehalt der Kartoffelknollen verringert ist. Der verringerte Wassergehalt führt zu verringerten Transportkosten und zu einer Reduzierung der beim Kochen erforderlichen Garzeit.

Es erscheint daher wünschenswert, Pflanzenzellen und Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die einen erhöhten Stärkegehalt aufweisen, sowie Verfahren zur Herstellung derartiger Pflanzenzellen und Pflanzen.

Ferner erscheint es wünschenswert, Stärken zur Verfügung zu stellen, deren Gehalt an Amylose und Amylopektin den Anforderungen der verarbeitenden Industrie entspricht. Dabei sind sowohl Stärken mit einem erhöhtem Amylosegehalt als auch Stärken mit einem verringerten Amylosegehalt von Interesse, da diese sich jeweils für besondere Verwendungszwecke besonders gut eignen.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Pflanzenzellen und Pflanzen zur Verfügung zu stellen, welche im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen und Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Ertrag vorzugsweise an Öl und/oder Stärke aufweisen und/oder eine Stärke mit einem veränderten Amylosegehalt synthetisieren.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht, dessen Vorhandensein oder dessen Expression zur Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokator-Aktivität in den transgenen Zellen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen aus Wildtyp-Pflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität führt. Möglich ist beispielsweise die sogenannte "in situ-Aktivierung", wobei die genetische Modifikation eine Veränderung der regulatorischen Bereiche endogener ADP/ATP-Translokator-Gene ist, die zu einer verstärkten Expression dieser Gene führt. Erreicht werden kann dies beispielsweise durch die Einführung eines sehr starken Promotors vor die entsprechenden Gene, z. B. durch homologe Rekombination.

Ferner besteht die Möglichkeit, die Methode des sogenannten "activation taggings" anzuwenden (siehe z. B. Walden et al., Plant J. (1991), 281-288; Walden et al., Plant Mol. Biol. 26 (1994), 1521-1528). Diese Methode beruht auf der Aktivierung endogener Promotoren durch "enhancer"-Elemente, wie z. B. dem Enhancer des 35S RNA-Promoters des Blumenkohlmosaikvirus oder dem Octopinsynthese-Enhancers.

In einer bevorzugten Ausführungsform besteht die genetische Modifikation jedoch darin, daß ein fremdes Nucleinsäuremolekül in das Genom der Pflanzenzelle eingeführt wird, welches einen plastidären ADP/ATP-Translokator codiert.

Der Begriff "transgen" bedeutet daher, daß die erfindungsgemäße Pflanzenzelle mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül stabil in dem Genom integriert enthält, vorzugsweise ein Nucleinsäuremolekül, das einen plastidären ADP/ATP-Translokator codiert.

Unter dem Begriff "fremdes Nucleinsäuremolekül" wird vorzugsweise ein Nucleinsäuremolekül verstanden, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators codiert und das entweder natürlicherweise in entsprechenden Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in den Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nucleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, dessen

Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt. Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen enthalten mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators codiert, wobei dieses vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor.

Prinzipiell kann das fremde Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das einen ADP/ATP-Translokator codiert, der nach Expression in der inneren Membran von Plastiden lokalisiert ist. Ein plastidärer ADP/ATP-Translokator ist dabei ein Protein, das den Transport von ATP in die Plastiden hinein und von ADP aus den Plastiden heraus katalysiert. Bekannt sind solche Nucleinsäuremoleküle beispielsweise aus *Arabidopsis thaliana* (Kampfenkel et al., FEBS Lett. 374 (1995), 351-355; Genbank Acc. No. X94626 und Acc. No. Z49227) oder aus Kartoffel (Genbank Acc. No. Y10821). Mit Hilfe dieser bekannten Nucleinsäuremoleküle ist es dem Fachmann möglich nach Standardverfahren, beispielsweise durch heterologes Screening, entsprechende Sequenzen aus anderen Organismen, insbesondere pflanzlichen zu isolieren. Es können insbesondere auch nicht-pflanzliche Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die einen ADP/ATP-Translokator codieren und die mit einer targeting-Sequenz verknüpft sind, die die Lokalisierung in der inneren Plastidenmembran gewährleistet. So ist z. B. ein ADP/ATP-Translokator aus *Rickettsia prowazekii* bekannt (Williamson et al., Gene 80 (1989), 269-278) und aus *Chlamydia trachomatis*.

In einer bevorzugten Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül einen plastidären ADP/ATP-Translokator aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere das in Kampfenkel et al. (1995, a. a. O.) beschriebene Protein AATP1.

Die erfindungsgemäßen Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein fremdes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder

dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße transgene Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die Zellen eingeführten Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen insbesondere dadurch unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt (vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die transgenen Pflanzenzellen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachweisen. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Ist das eingeführte Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, können die erfindungsgemäßen Zellen von natürlicherweise auftretenden Zellen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die transgenen Pflanzenzellen enthalten vorzugsweise mehr Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern Blot Analyse nachgewiesen werden.

Der Begriff "genetisch modifiziert" bedeutet, daß die Pflanzenzelle durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in ihrer genetischen Information verändert ist und daß das Vorhandensein oder die Expression des fremden



Nucleinsäuremoleküls zu einer phänotypischen Veränderung führt. Phänotypische Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine meßbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression des eingeführten Nucleinsäuremoleküls eine Erhöhung der Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators.

Der Begriff "Erhöhung der Aktivität" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression eines plastidären ADP/ATP-Translokator-Gens, eine Erhöhung der Menge an plastidären ADP/ATP-Translokator-Protein und/oder eine Erhöhung der Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators in den Zellen.

Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an ADP/ATP-Translokator codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 20%, insbesondere um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 75%.

Die Erhöhung der Menge an ADP/ATP-Translokator-Protein kann beispielsweise bestimmt werden durch Western-Blot-Analyse. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an ADP/ATP-Translokator-Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 20%, insbesondere um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 75%.

Die Aktivität des plastidären ADP/ATP-Translokators läßt sich beispielsweise bestimmen, indem Plastiden aus entsprechendem Gewebe isoliert werden und die  $V_{\max}$ -Werte des ATP-Imports mittels der Silikonölfiltrationsmethode bestimmt werden. Die Reinigung verschiedener Plastidentypen ist z. B. beschrieben in Neuhaus et al. (Biochem J. 296 (1993), 395-401). Die Silikonölfiltrationsmethode ist z. B. beschrieben in Quick et al. (Plant Physiol. 109 (1995), 113-121).

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß bei Pflanzen, die derartige Pflanzenzellen mit erhöhter Aktivität des plastidären ADP/ATP-Translokators enthalten, der Ertrag an Inhaltsstoffen und/oder Biomasse zu entsprechenden nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen erhöht ist. Es wurde beispielsweise gefunden, daß in erfindungsgemäßen Pflanzen der Ölgehalt und/oder der Stärkegehalt im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen erhöht ist und/oder daß auch der Amylosegehalt dieser Stärken im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen erhöht ist.

Der Begriff "Wildtyp-Pflanze" bedeutet dabei, daß es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der beschriebenen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff "erhöhter Ertrag" bedeutet dabei, daß der Gehalt an Inhaltsstoffen, vorzugsweise an Stärke oder Öl in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 20%, besonders bevorzugt um mindestens 30% und insbesondere um mindestens 40% im Vergleich zu Pflanzenzellen von nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen erhöht ist.

Der Begriff "erhöhter Stärkegehalt" bedeutet dabei, daß der Gehalt an Stärke in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 20%, besonders bevorzugt um mindestens 30% und insbesondere um mindestens 40% im Vergleich zu Pflanzenzellen von nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen erhöht ist.

Die Bestimmung des Stärkegehalts erfolgt dabei nach den in den angefügten Beispielen beschriebenen Methoden.

Der Begriff "erhöhter Amylosegehalt" bedeutet dabei, daß der Amylosegehalt der in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen synthetisierten Stärke um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 20%, besonders bevorzugt um mindestens 30% und insbesondere um mindestens 40% im Vergleich zu Pflanzenzellen von nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen erhöht ist.

Die Bestimmung des Amylosegehalts erfolgt dabei nach den in den angefügten Beispielen beschriebenen Methoden.

Wie oben erwähnt ist der plastidäre ADP/ATP-Translokator ein Transportprotein, das in der inneren Membran von Plastiden lokalisiert ist (Heldt et al., FEBS Lett. 5 (1969), 11-14; Pozueta-Romero et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88 (1991), 5769-5773; Neuhaus, Plant Physiol. 101 (1993) 573-578; Schünemann et al., Plant Physiol. 103 (1993), 131-137) und das den Transport von ATP in die Plastiden hinein und von ADP aus den Plastiden hinaus katalysiert. Somit sorgt der plastidäre ADP/ATP-Translokator für die Versorgung des Stromas mit cytosolischem ATP.

Kampfenkel et al. (FEBS Lett. 374 (1995), 351-355) isolierten erstmals eine cDNA, die einen ADP/ATP-Translokator (AATP1) aus *Arabidopsis thaliana* codiert (Neuhaus et al., Plant J. 11 (1997), 73-82) und die eine große Ähnlichkeit (66.2 % Ähnlichkeit) zum ADP/ATP-Translokator des Gram-negativen Bakteriums *Rickettsia prowazekii* aufweist. Die AATP1-cDNA aus *A. thaliana* codiert ein stark hydrophobes Protein bestehend aus 589 Aminosäuren, das 12 potentielle Transmembranhelices aufweist (Kampfenkel et al., FEBS Lett. 374 (1995), 351-355). Diese cDNA konnte in Bäckerhefe und *E. coli* funktional exprimiert werden. Nach Extraktion des Proteins und Rekonstitution in Proteoliposomen konnte eine Steigerung der ATP-Transportrate festgestellt werden (Neuhaus et al., Plant J. 11 (1997), 73-82). Mit Hilfe von Antikörpern gegen ein Peptidfragment des AATP1 aus *A. thaliana* konnte gezeigt werden, daß der ADP/ATP-Translokator AATP1 in der inneren Chloroplastenhüllmembran lokalisiert ist (Neuhaus et al., Plant J. 11 (1997), 73-82).

Die Funktion des plastidären ADP/ATP-Translokators für den pflanzlichen Stoffwechsel konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Verschiedene Funktionen wurden in Erwägung gezogen, wie z. B., daß die Versorgung des Stromas mit cytosolischem ATP einen Einfluß auf den Import von Proteinen in den Plastiden hinein, auf die Aminosäurebiosynthese, den Fettsäuremetabolismus oder auf den Stärkemetabolismus haben könnte (Flügge und Hinz, Eur. J. Biochem. 160 (1986), 563-570; Tetlow et al., Planta 194 (1994), 454-460; Hill and Smith, Planta 185 (1991), 91-96; Kleppinger-Sparace et al., Plant Physiol. 98 (1992), 723-727).

Daß eine Steigerung der Aktivität des plastidären ADP/ATP-Translokators zu einer Erhöhung des Stärkegehalts in entsprechenden transgenen Pflanzen führt, war jedoch völlig überraschend. Ebenso überraschend ist es, daß die Steigerung der

Aktivität des plastidären ADP/ATP-Translokators Auswirkungen auf die molekulare Zusammensetzung der erzeugten Stärke hat. So weist beispielsweise Stärke aus Knollen erfindungsgemäßer Kartoffelpflanzen einen erhöhten Amylosegehalt auf im Vergleich zu Stärken aus Knollen nicht-transformierter Kartoffelpflanzen.

Bisher wurde angenommen, daß die molekularen Eigenschaften von Stärken ausschließlich durch die Wechselwirkung von stärke-synthetisierenden Enzymen bestimmt werden, wie z.B. der Verzweigungsenzyme (E.C. 2.4.1.18), der Stärkesynthasen (E.C. 2.4.1.21) und der ADP-Glucosepyrophosphorylase (E.C. 2.7.7.27). Daß die Expression eines plastidären Transportproteins einen Einfluß auf die Struktur der Stärke hat, ist dagegen völlig überraschend.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, d.h. sowohl aus monokotylen als auch aus dikotylen Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Allgemein bevorzugt sind Pflanzenzellen aus öl- und/oder stärke-synthetisierenden bzw. öl- und/oder stärke-speichernden Pflanzen. Vorzugsweise betrifft die Erfindung somit Pflanzenzellen aus stärke-synthetisierenden bzw. stärke-speichernden Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Sago etc.), Reis, Erbse, Mais, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, oder Gemüsearten (Tomate, Chicoree, Gurken, Salat etc.). Bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Kartoffel, Sonnenblume, Sojabohne, Reis. Besonders bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Mais, Weizen, Raps und Reis.

Ferner sind Gegenstand der Erfindung transgene Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können beispielsweise durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere

industrielle Zwecke. Dies können öl- und/oder stärke-synthesisierende bzw. öl- und/oder stärke-speichernde Pflanzen sein. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Sago etc.), Reis, Erbse, Mais, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume oder Gemüsearten (Tomate, Chicoree, Gurken, Salat etc.). Bevorzugt sind Kartoffel, Sonnenblume, Sojabohne, Reis. Besonders bevorzugt sind Mais, Weizen, Raps und Reis.

Wie vorstehend ausgeführt, wurde überraschenderweise gefunden, daß bei stärke-speichernden Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen mit erhöhter Aktivität des plastidären ADP/ATP-Translokators enthalten, der Stärkegehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen erhöht ist und/oder daß auch der Amylosegehalt dieser Stärken im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen erhöht ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung somit auch stärke-speichernde Pflanzen, die die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen enthalten und die im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Stärkegehalt und/oder einen erhöhten Amylosegehalt dieser Stärke im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

Der Begriff "stärke-speichernde Pflanzen" umfaßt alle Pflanzen mit stärke-speichernden Geweben, wie z.B. Mais, Weizen, Reis, Kartoffel, Roggen, Gerste, Hafer. Bevorzugt sind Reis, Gerste und Kartoffel. Besonders bevorzugt sind Mais und Weizen.

Eine Erhöhung des "Ertrags" ("erhöhter Ertrag"), eine Erhöhung des Stärkegehalts ("erhöhter Stärkegehalt"), eine Erhöhung des Amylosegehalts ("erhöhter Amylosegehalt") und der Begriff "Wildtyp-Pflanze" werden dabei wie bereits oben definiert verstanden und werden auch für die folgenden Ausführungsformen der Erfindung in diesem Sinne verwendet. Der Begriff "erhöhter Ertrag" bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Produktion an Inhaltsstoffen und/oder Biomasse, insbesondere, wenn diese am Frischgewicht pro Pflanze gemessen wird.

Eine derartige Erhöhung des Ertrags bezieht sich vorzugsweise auf erntebare Pflanzenteile wie Samen, Früchte, Speicherwurzeln, Wurzeln Knollen, Blüten, Knospen, Sprosse, Stämme oder Holz.

Die Erhöhung des Ertrags beträgt erfindungsgemäß mindestens 3 %, bezogen auf die Biomasse und/oder Inhaltsstoffe, im Vergleich zu entsprechenden nicht-transformierten Pflanzen desselben Genotyps, wenn diese unter denselben Bedingungen kultiviert werden, bevorzugt mindestens 10 %, besonders bevorzugt mindestens 20 % und insbesondere bevorzugt mindestens 30 % oder gar 40% im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen.

Derartige erfindungsgemäße Pflanzen besitzen beispielsweise gegenüber anderen Pflanzen, die Stärken mit erhöhtem Amylosegehalt synthetisieren, wie z.B. den *amylose-extender*- und den *dull*-Mutanten von Mais, den Vorteil, daß sie neben einem erhöhten Amylosegehalt keinen verringerten, sondern sogar einen erhöhten Stärkegehalt aufweisen.

Ferner sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung ölspeichernde Pflanzen, die die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen enthalten und die im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen, vorzugsweise in Zellen ölspeichernder Gewebe, einen erhöhten Ölgehalt aufweisen.

Der Begriff "ölspeichernde Pflanzen" umfaßt alle Pflanzen, die Öl speichern können, wie z.B. Raps, Canola, Sojabohne, Sonnenblume, Mais, Erdnuß, Weizen, Baumwolle, Ölpalmen, Olivenbäume und Avocado. Bevorzugt sind Mais, Weizen und Sojabohne. Besonders bevorzugt sind Raps und Canola.

Der Begriff "erhöhter Ölgehalt" bedeutet dabei, daß der Gehalt an Öl in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen um mindestens 10% bevorzugt um mindestens 20%, besonders bevorzugt um mindestens 30% und insbesondere um mindestens 40% im Vergleich zu Pflanzenzellen von nicht-modifizierten Wildtyp-Pflanzen erhöht ist.

Methoden zur Bestimmung des Ölgehalts sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben bei Matthaeus und Bruehl, GIT Labor-Fachz. 43 (1999), 151-152, 154-155; Matthaeus, Laborpraxis 22 (1998), 52-55. Die Bestimmung des Ölgehalts kann auch durch nichtinvasive Nahinfrarotspektroskopie erfolgen. Es

handelt sich hierbei um eine (gängige züchterische) Analysenmethode, die beispielsweise beschrieben wurde bei: Schulz et al., J. Near Infrared Spectrosc. 6 (1998), A125-A130; Starr et al., J. Agric. Sci. 104 (1985), 317-323.

Pflanzen, die eine erhöhte Konzentration an Öl aufweisen sind von großem kommerziellen Interesse. Maispflanzen beispielsweise, deren Körner neben einem hohen Gehalt an Stärke einen erhöhten Gehalt am Nebenprodukt Öl aufweisen, sind für die "wet milling industry" von großem Interesse, weil das Nebenprodukt einen hohen Wert besitzt. Auch die Futtermittelindustrie interessiert sich für Futterpflanzen mit erhöhtem Ölgehalt, weil solche Pflanzen einen erhöhten Nährwert aufweisen. Für die Ölpflanzen-verarbeitende Industrie bedeutet eine Steigerung des Ölgehalts eine Steigerung der Effizienz des Ölextraktionsprozesses.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, die einen erhöhten Ertrag im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen, wobei

- (a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls und die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators führt; und
- (b) aus der Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls
- (c) aus der Pflanze nach (b) weitere Pflanzen erzeugt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, die einen erhöhten Stärkegehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen und/oder deren Stärke einen erhöhten Amylosegehalt im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist, wobei

- (a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls und die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators führt; und
- (b) aus der Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls
- (c) aus der Pflanze nach (b) weitere Pflanzen erzeugt werden.

Ferner ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, die einen erhöhten Ölgehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen, wobei

- (a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls und die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators führt; und
- (b) aus der Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls
- (c) aus der Pflanze nach (b) weitere Pflanzen erzeugt werden.

Für die laut Schritt (a) in die Pflanzenzelle eingeführte Modifikation gilt dasselbe, was bereits oben im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen erläutert wurde.

Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) der erfindungsgemäßen Verfahren kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge, Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen sowie der gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten transgenen Pflanzen, das erfindungsgemäße genetisch modifizierte Zellen enthält. Der Begriff Vermehrungsmaterial umfaßt dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc.



Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen, besonders bevorzugt Samen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit einem im Vergleich zum Wildtyp-Pflanzen erhöhten Ertrag.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren, zur Herstellung von Pflanzen mit einem im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen erhöhten Stärkegehalt in stärke synthetisierenden und/oder -speichernden Geweben, oder zur Herstellung von Pflanzen, die eine Stärke synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Amylosegehalt aufweist. Bevorzugt werden dabei die oben im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Zellen genannten Nucleinsäuremoleküle verwendet.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit einem Vergleich zum Wildtyp-Pflanzen erhöhten Ölgehalt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner transgene Pflanzenzellen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden plastidären ADP/ATP-Translokators führt im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen entsprechender Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff "transgen" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen aufgrund einer genetischen Modifikation, insbesondere der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in ihrer

genetischen Information von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen abweichen.

Der Begriff "genetisch modifiziert" bedeutet dabei in diesem Zusammenhang, daß die Pflanzenzelle durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in ihrer genetischen Information verändert ist und daß das Vorhandensein oder die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls zu einer phänotypischen Veränderung führt. Phänotypische Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine meßbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Verringerung der Aktivität eines plastidären ADP/ATP- Translokators.

Die Herstellung derartiger erfindungsgemäßer Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität eines ADP/ATP-Translokators kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Verfahren erzielt werden, z. B. durch solche, die zu einer Inhibierung der Expression endogener Gene führen, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren. Hierzu zählen beispielsweise die Expression einer entsprechenden anti-sense-RNA, die Expression einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressions-effektes, die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die einen ADP/ATP-Translokator codieren, oder die sogenannte "in-vivo Mutagenese".

Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität eines ADP/ATP-Translokators in den erfindungsgemäßen Zellen eine antisense-RNA exprimiert.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte einen ADP/ATP-Translokator codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle

verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den endogenen in der Pflanzenzelle vorkommenden Sequenzen haben, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

Alternativ kann die Verringerung der ADP/ATP-Translokator-Aktivität in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen auch durch einen Cosuppressionseffekt erfolgen. Das Verfahren ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al. (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) und anderen Quellen.

Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Proteinen in Zellen ist dem Fachmann ebenfalls bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0 321 201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z. B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338).

Ferner kann die Verringerung der ADP/ATP-Translokator-Aktivität in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen auch durch die sogenannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Zellen eingeführt wird (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim "5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15 (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung

WO 95/15972; Kren et al., Hepatology 25 (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273 (1996), 1386-1389).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nucleinsäuresequenz eines endogenen ADP/ATP-Translokators, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz des endogenen ADP/ATP-Translokators eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nucleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität des plastidären ADP/ATP-Translokators.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher insbesondere auch transgene Pflanzenzellen,

- (a) die ein DNA-Molekül enthalten, das zur Synthese einer antisense RNA führen kann, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren, bewirkt; und/oder
- (b) die ein DNA-Molekül enthalten, das zur Synthese einer Cosuppressions-RNA führen kann, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen, die einen ADP/ATP-Translokator codieren, bewirkt;
- (c) die ein DNA-Molekül enthalten, das zur Synthese eines Ribozyms führen kann, welches spezifisch Transkripte von endogenen Genen, die einen ADP/ATP-Translokator codieren, spalten kann; und/oder
- (d) die aufgrund einer in vivo-Mutagenese eine Mutation oder eine Insertion einer heterologen DNA-Sequenz in mindestens einem endogenen, einen plastidären ADP/ATP-Translokator codierenden Gen aufweisen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression des Gens bewirkt, oder die Synthese eines inaktiven Transportermoleküls.

Der Begriff "Verringerung der Aktivität" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verringerung der Expression endogener Gene, die einen ADP/ATP-

Translokator codieren, eine Verringerung der Menge an ADP/ATP-Translokator-Protein in den Zellen und/ oder eine Verringerung der biologischen Aktivität des ADP/ATP-Translokator-Proteins in den Zellen.

Die Verringerung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an ADP/ATP-Translokator codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse. Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 85% und ganz besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Die Verringerung der Menge an ADP/ATP-Translokator-Protein kann beispielsweise bestimmt werden durch Western-Blot-Analyse. Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an ADP/ATP-Translokator-Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 85% und ganz besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß bei Pflanzenzellen, bei denen die Expression und somit die Aktivität des plastidären ADP/ATP-Translokators verringert ist, der Stärkegehalt im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Pflanzenzellen aus Wildtyp-Pflanzen verringert ist und daß auch der Amylosegehalt dieser Stärken im Vergleich zu entsprechenden nicht modifizierten Pflanzenzellen aus Wildtyp-Pflanzen verringert ist. Insbesondere die Tatsache, daß die Stärken der erfindungsgemäßen Pflanzen eine veränderte Zusammensetzung besitzen, ist überraschend, weil bisher angenommen wurde, daß die molekularen Eigenschaften von Stärken ausschließlich durch die Wechselwirkung von stärke-synthetisierenden Enzymen bestimmt werden, wie z.B. der Verzweigungsenzyme (E.C. 2.4.1.18) und der Stärkesynthasen (E.C. 2.4.1.21). Daß die Expression eines plastidären Transportproteins einen Einfluß auf die Struktur der Stärke hat, ist völlig überraschend.

Der Begriff "verringertes Stärkegehalt" bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, daß der Gehalt an Stärke in erfindungsgemäßen

Pflanzenzellen um mindestens 15%, bevorzugt um mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 40% und insbesondere um mindestens 50% im Vergleich zu Pflanzenzellen von nicht modifizierten Pflanzen Wildtyp-Pflanzen verringert ist. Die Bestimmung des Stärkegehalts erfolgt dabei nach den in den Beispielen beschriebenen Methoden.

Der Begriff "verringertes Amylosegehalt" bedeutet dabei, daß der Gehalt an Amylose in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 20%, besonders bevorzugt um mindestens 30% und insbesondere um mindestens 40% im Vergleich zu Pflanzenzellen von nicht modifizierten Pflanzen Wildtyp-Pflanzen verringert ist. Die Bestimmung des Amylosegehalts erfolgt dabei nach den in den Beispielen beschriebenen Methoden.

Der Begriff "Wildtyp-Pflanze" ist dabei wie oben definiert zu verstehen.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, d.h. sowohl aus monokotylen als auch aus dikotylen Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung somit Pflanzenzellen aus stärke-synthetisierende bzw. stärke-speichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Sago etc.), Reis, Erbse, Mais, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse oder Arrowroot. Besonders bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Kartoffel.

Ferner sind Gegenstand der Erfindung transgene Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise sind dies stärke-synthetisierende bzw.

stärkespeichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Sago etc.), Reis, Erbse, Mais, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse oder Arrowroot. Besonders bevorzugt ist Kartoffel.

Derartige erfindungsgemäße Pflanzen synthetisieren eine Stärke die im Vergleich zur Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen einen verringerten Amylosegehalt aufweist. Die Begriffe "Verringerung des Amylosegehalts" und "Wildtyp-Pflanzen" sind dabei wie oben beschrieben definiert.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, deren Stärke einen verringerten Amylosegehalt im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist, wobei

- (a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls und die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines endogen in pflanzlichen Zellen vorkommenden plastidären ADP/ATP-Translokators führt; und
- (b) aus der Zelle gemäß Schritt (a) hergestellten eine Pflanze regeneriert wird; und
- (c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.

Für die laut Schritt (a) in die Pflanzenzelle eingeführte Modifikation gilt dasselbe, was bereits oben im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen erläutert wurde.

Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) der erfindungsgemäßen Verfahren kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge, Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise

kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung transgener Kartoffelpflanzen verwendet.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen sowie der gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten transgenen Pflanzen, das erfindungsgemäße genetisch modifizierte Zellen enthält. Der Begriff Vermehrungsmaterial umfaßt dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Samen und besonders bevorzugt um Knollen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren, von deren Komplementen oder von Teilen solcher Moleküle zur Herstellung von Pflanzen, die eine Stärke mit im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen verringerten Amylosegehalt synthetisieren. Hierfür kommen bevorzugt die Nucleinsäuremoleküle in Betracht, die oben im Zusammenhang mit erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, die eine erhöhte ADP/ATP-Translokatoraktivität aufweisen, genannt wurden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens*



oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 29-33.).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11 (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13 (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2 (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO 95/06128, EP 0513849, EO 0465875, EP 292435; Fromm et al., Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2 (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80 (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296 (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5 (1994), 285-297).

Zur Expression der Nucleinsäuremoleküle, die einen ADP/ATP-Translokator codieren, in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in

pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Sowohl in Bezug auf die Pflanze als auch in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor, Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) oder Shrunken-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 9307279). Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren verwendet werden, wie z.B. der USP-Promoter aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

Die vorgenannten Ausführungsformen mit den endospezifischen Promotoren sind insbesondere zur Steigerung des Stärkegehalts im Endosperm geeignet. Im

Gegensatz dazu ist die Verwendung embryospezifischer Promotoren insbesondere zur Steigerung des Ölgehalts von Interesse, weil in der Regel Öl vorwiegend im Embryo gespeichert wird.

Daher wird gemäß vorliegender Erfindung auch vorzugsweise ein Promotor verwendet, der die Expression im Embryo bzw. im Samen gewährleistet. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Promotor der Globulin-1 (glb1)-Promotor aus Mais (Styer and Cantliffe, Plant Physiol. 76 (1984), 196-200). In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der embryospezifische Promotor aus Pflanzen, vorzugsweise aus *Cuphea lanceolata*, *Brassica rapa* oder *Brassica napus*. Besonders bevorzugt sind die Promotoren pClFatB3 und pClFatB4 (WO 95/07357). Es handelt sich hierbei um Promotoren der Gene ClFatB3 bzw. ClFatB4, die in transgenem Raps bereits erfolgreich zur Biosynthese mittelkettiger Fettsäuren eingesetzt wurden, und daher ein geeignetes Expressionsfenster zur Lösung des vorliegenden Problems besitzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der pClGPDH-Promotor (WO 95/06733), der Napin- (beispielsweise beschrieben bei Kridl, Seed Sci. Res. 1 (1991), 209-219; Ellerstrom et al., Plant Mol. Biol. 32 (1996), 1019-1027; Stalberg et al., Planta 199 (1996), 515-519) oder der Oleosin-Promotor (beispielsweise beschrieben bei Keddie, Plant Mol. Biol. 24 (1994), 327-340; Plant et al., Plant Mol. Biol. 25 (1994), 193-205) verwendet.

Ferner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. z.B. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren vorzugsweise aufgrund der Erhöhung oder Verringerung der Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators, eine Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis im

Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Gelbildungseigenschaften von Kleistern dieser Stärke im Vergleich zu Wildtypstärke verändert sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ferner Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanze und/oder aus stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfaßt ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen und/oder stärke-speichernder Teile dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten. Verfahren zur Extraktion der Stärke von Pflanzen oder von stärke-speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen anderen stärke-speichernden Pflanzen beschrieben, z. B. in "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996) 54-57, die Extraktion von Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das sogenannte "wet milling" erreicht.)). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner Stärke, die aus den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen, Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial erhältlich ist, und Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich. Grundsätzlich läßt sich die Einsatzmöglichkeit der Stärke in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken. Der andere Bereich, in dem die Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

## 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsmittel und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

### 2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfluß von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

### 2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf

Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

### 2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsstoff zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

### 2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

### 2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach

heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

## 2.6 Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

## 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

## 2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als



Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

#### 2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

#### 2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittelversetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

#### 2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

#### 2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

### 2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozeß (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyethylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch

vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des weiteren sind Stärke/Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer transgenen Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren

chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Oxidation und
- Veresterungen,

welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden:

- Erzeugung von Stärkeethern  
Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether,  
O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten

**Figur 1** zeigt schematisch das Plasmid pJT31 (AATP1 (*Arabidopsis thaliana*) sense);

**Figur 2** zeigt schematisch das Plasmid pJT32 (AATP1 (*Solanum tuberosum*) antisense);

- Figur 3** zeigt den Aminosäuresequenzvergleich des AATP2 aus *Arabidopsis thaliana* mit dem AATP1 (*A. thaliana*) und einem homologen Protein aus *Rickettsia prowazekii* (Williamson et al., Gene 80 (1989), 269-278);
- Figur 4** Hydropathie-Analyse von AATP2 (*A. thaliana*), AATP1 (*A. thaliana*) und dem *Rickettsia* ADP/ATP-Translokator nach der Methode von von Heijne et al. (Eur. J. Biochem. 180 (1989), 535-545.) durchgeführt
- Figur 5** zeigt eine Northern Blot Analyse der Expression des AATP1 (*Solanum tuberosum*) in Blatt und Knolle von ADP/ATP-Translokator-antisense-Pflanzen.
- Figur 6** zeigt eine Northern Blot Analyse der Expression des AATP1 (*Arabidopsis thaliana*) in Blatt und Knolle von ADP/ATP-Translokator-Überexpressionspflanzen.
- Figur 7** Schematische Karte der Kasette zur embryospezifischen Genexpression pTE200. EcoRI, SmaI, BamHI, XhoI, NotI, XbaI, SacI, KpnI, ApaI, SalI und SfiI markieren Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen. Aus praktischen Gründen unterscheiden sich SfiI (A) und SfiI (B) in der variablen Nukleotidfolge innerhalb der Erkennungssequenz. Die Abkürzungen kodieren wie folgt: PCIFatB4 = CIFatB4-Promotor, tCIFatB4 = CIFatB4-Terminator, amp = bakterielle Resistenz gegenüber Ampicillin, ColE1 ori = "origin of replication" aus dem Plasmid ColE1, f1(-) ori = "origin of replication" aus dem Phagen f1.
- Figur 8** Schematische Karte der ADP/ATP-Translokatorexpressionskasette pTE208: dieses Derivat des Vektors pTE200 (Figur 7) trägt eine cDNA codierend für einen plastidären ADP/ATP-Translokator aus *Solanum tuberosum* in sense -Orientierung.

**Figur 9** Schematische Karte des binären Vektors pMH000-0. SfiI, SalI, ClaI, HindIII, EcoRI, NsiI, SmaI, BamHI, SpeI, NotI, KpnI, BglII, ApaI, XhoI, XbaI und BstEII markieren Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen. SfiI (A) und SfiI (B) unterscheiden sich in der variablen Nukleotidfolge ihrer Erkennungssequenz wie angegeben. Dadurch wird nach SfiI-Spaltung eine Rezirkularisierung des Ausgangsplasmids unterbunden und eine gerichtete Insertion der Expressionskassette aus dem pTE200-Derivat möglich. Die Abkürzungen kodieren wie folgt: RB, LB = rechte und linke Grenzregion, t35S – Terminationssignal des 35S *rna* Gens aus CaMV, pat = Phosphinotricinacetyltransferasegen, p35S = Promotor des 35S *rna* Gens aus CaMV, p35S(min) = Minimalpromotor des 35S *rna* Gens aus CaMV, tp-*sul* = Sulfonamidresistenzgen mit Transitpeptide, *tnos* = Terminationssignal des Nopalinsynthasegens, Sm/Sp = bakterielle Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin, parA, parB und parR = Plasmidvermehrungsfunktionen aus dem Plasmid pVS1 mit großem Wirtsbereich u. a. für *Agrobacterium tumefaciens* und *Escherichia coli*.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

### Beispiel 1

#### Konstruktion des bakteriellen Expressionsvektors pJT118 und Transformation von *E. coli*

Das AATP2-Protein (Genbank X94626) aus *Arabidopsis thaliana* wurde N-terminal mit einem "Histidin-tag" umfassend 10 Aminosäuren fusioniert.

Hierfür wurde die cDNA, die das gesamte AATP2-Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert, mit Hilfe eines PCR-Ansatzes isoliert. Als sense-Primer diente folgendes

Oligonucleotid, welches zusätzlich eine XhoI-Restriktionsschnittstelle trug: cgtgagagatagagagctcgagggtctgattcaaacc (SEQ ID NO: 1); umfaßt die Basenpaare 66-102).

Als antisense-Primer diente ein Oligonucleotid, welches eine zusätzliche BamHI-Restriktionsschnittstelle trug: gatacaacaggaatcctggatgaagc (SEQ ID NO: 2); umfaßt die Basenpaare 1863-1835). Das erhaltene PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt, mit den Restriktionsenzymen XhoI/BamHI geschnitten und "in frame" in das Plasmid pET16b (Novagene, Heidelberg, Germany) eingeführt. Dies führte dazu, daß die cDNA, die das gesamte AATP2-Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert, am N-Terminus einen Histidine-tag aus 10 Aminosäuren aufweist (His-AATP2). Dieser Vektor wurde pJT118 genannt. Die Sequenz des PCR-Produktes wurde durch Sequenzierung beider Nucleotidstränge überprüft (Eurogentec). Die Transformation von *E. coli* C43 (Miroux and Walker, J. Mol. Biol. 260 (1996), 289-298) erfolgte nach Standardmethoden.

Der Stamm *E. coli* C43 erlaubt die heterologe Expression von tierischen (Miroux and Walker, a.a.O.) und pflanzlichen (Tjaden et al., J. Biol. Chem. (1998) (in press)) Membranproteinen.

Nach Transformation dieses Stammes mit dem Vektor pJT118 wurden Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem ADP und ATP durchgeführt. Mit Hilfe dieser Studien konnte gezeigt werden, daß His-AATP2 in *E. coli* C43 funktional in der Cytoplasmamembran von *E. coli* exprimiert werden kann. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß AATP2 tatsächlich einen ADP/ATP-Translokator codiert. Das Vorhandensein eines N-terminalen Histidine-tags führt zu einer Erhöhung (2x-3x) der Transportaktivität des AATP2 aus *A. thaliana* in *E. coli* im Vergleich zum AATP2 ohne N-terminalen His-tag.

## Beispiel 2

### Konstruktion des Plasmids pJT31 und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Zur Konstruktion eines Pflanzentransformationsvektors wurde ein 2230 bp langes EcoRV/BamHI-Fragment der AATP1-cDNA aus *A. thaliana* (Kampfenkel et al., FEBS Letters 374 (1995), 351-355) in den mit SmaI/EcoRV und BamHI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) ligiert. Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette (pJT31), die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (s. Fig. 1):

Das Fragment A (540 bp) enthält den 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus.

Das Fragment B enthält neben den flankierenden Bereichen die proteincodierende Region eines ADP/ATP-Translokators aus *A. thaliana* (AATP1). Diese wurde wie oben beschrieben isoliert und in sense-Orientierung an den 35S-Promotor in pBinAR fusioniert.

Fragment C (215 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die Größe des Plasmids pJT31 beträgt ca. 14,2 kb.

Das Plasmid wurde mit Hilfe von Agrobakterien wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8 (1989), 23-29) in Kartoffelpflanzen transferiert. Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen eine Erhöhung der mRNA eines plastidären ADP/ATP-Translokators. Dies wurde mittels Northern Blot Analyse nachgewiesen (s. Fig. 6). Dazu wurde RNA nach Standardprotokollen aus Blatt- und Knollengewebe von Kartoffelpflanzen isoliert. 50µg RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5% Agarose, 1x MEN-Puffer, 16,6% Formaldehyd). Nach der Elektrophorese wurde die RNA mit 20x SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran Hybond N (Amersham, UK) übertagen. Die RNA wurde auf der Membran durch UV-Bestrahlung fixiert. Die Membran wurde in Phosphathybridisierungspuffer (Sambrook et al., a.a.O) für 2h prähybridisiert und anschließend durch Zugabe der radioaktiv markierten Sonde für 10h hybridisiert.



### Beispiel 3

#### Konstruktion des Plasmids pJT32 und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Zur Konstruktion eines Pflanzentransformationsvektors wurde ein 1265 bp langes BamHI/NdeI- Fragment der codierenden Region der AATP1-cDNA aus *S. tuberosum* (Genbank Y10821) in den mit SmaI/NdeI und BamHI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) ligiert.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (s. Fig. 2):

Das Fragment A (540 bp) enthält den 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus.

Das Fragment B enthält eine 1265 bp lange Region eines ADP/ATP-Translokators aus *S. tuberosum* (AATP1 S.t.). Diese wurde in antisense-Orientierung an den 35S-Promotor in pBinAR fusioniert.

Fragment C (215 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die Größe des Plasmids pJT32 beträgt ca. 13,3 kb.

Das Plasmid wurde mit Hilfe von *Agrobacterien* wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8 (1989), 23-29) in Kartoffelpflanzen transferiert.

Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen eine Verringerung der mRNA eines plastidären ADP/ATP-Translokators. Dies wurde mittels Northern Blot Analyse nachgewiesen (s. Fig. 5). Dazu wurde RNA nach Standardprotokollen aus Blatt- und Knollengewebe von Kartoffelpflanzen isoliert. 50µg RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5% Agarose, 1x MEN-Puffer, 16,6% Formaldehyd). Nach der Elektrophorese wurde die RNA mit 20x SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran Hybond N (Amersham, UK) übertagen. Die RNA wurde auf der Membran durch UV-Bestrahlung fixiert. Die Membran wurde in Phosphathybridisierungspuffer (Sambrook et al., a.a.O) für 2h prähybridisiert und anschließend durch Zugabe der radioaktiv markierten Sonde für 10h hybridisiert.

### Beispiel 4

#### Analyse des Stärke-, Amylose- und des Zuckergehalts transgener Kartoffelpflanzen

Die Bestimmung des Gehaltes an löslichen Zuckern erfolgte wie bei Lowry und Passonneau in "A Flexible System of Enzymatic Analysis", Academic Press, New York, USA (1972) beschrieben. Die Bestimmung des Gehaltes an Stärke erfolgte wie bei Batz et al. (Plant Physiol. 100 (1992), 184-190) beschrieben.

Tabelle 1:

Linie/Genotyp	Stärke in ( $\mu\text{molC6units/g}$ Frischgewicht)	Lösliche Zucker in ( $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht)
Desiree/WT	1094.0	26.49
654 /antisense-AATP1 (S. tuberosum)	574.2	42.52
594/antisense-AATP1 (S. tuberosum)	630.2	48.76
595/antisense-AATP1 (S. tuberosum)	531.4	45.92
676/antisense-AATP1 (S. tuberosum)	883.0	40.60
62/ sense-AATP1(A. thaliana)	1485.0	30.65
98/ sense-AATP1(A. thaliana)	1269.0	18.28
78/sense-AATP1(A. thaliana)	995.0	20.50

Die Bestimmung des Gehaltes an Amylose erfolgte wie bei Hovenkamp-Hermelink et al. (Potato Res. 31 (1988), 241-246) beschrieben:

Linie/Genotyp	% Amylose
Desiree/WT	18.8
654 /antisense-AATP1 ( <i>S. tuberosum</i> )	15.5
594/antisense-AATP1 ( <i>S. tuberosum</i> )	14.3
595/antisense-AATP1 ( <i>S. tuberosum</i> )	18.0
676/antisense-AATP1 ( <i>S. tuberosum</i> )	11.5
62/ sense-AATP1 ( <i>A. thaliana</i> )	27.0
98/ sense-AATP1 ( <i>A. thaliana</i> )	22.7
78/sense-AATP1 ( <i>A. thaliana</i> )	24.5

### Beispiel 5

#### Herstellung einer Expressionskassette und Transformation von Rapspflanzen

Die Expressionskassette pTE200 in einem pBluescript-Derivat (Short *et al.*, Nucl. Acid Res. 16, (1988), 7583-7600) trägt die Promotor- und Terminatorsequenzen des Thioesterase-Gens ClFatB4 (GenBank Accession: AJ131741) aus *Cuphea lanceolata* und geeignete Polylinkersequenzen zur Aufnahme verschiedener Nutzgene. Randständige SfiI-Erkennungsstellen mit nicht-kompatiblen Nukleotiden in der variablen Erkennungsregion erlauben einen gerichteten Transfer der gesamten Expressionskassette einschließlich des Nutzgens in die entsprechenden Restriktionsstellen des binären Plasmidvektors pMH000-0, einer Weiterentwicklung von pLH9000 (Hausmann und Töpfer, (1999): 9. Kapitel "Entwicklung von Plasmid-Vektoren" in Bioengineering für Rapssorten nach Maß, D. Brauer, G. Röbbelen und

R. Töpfer (eds.) Vorträge für Pflanzenzüchtung Heft 45, 155-172), und verhindern beim aufnehmenden Vektor eine Rezirkularisierung der DNA.

Zur Herstellung der Expressionskassette pTE200 wurde zunächst aus dem genomischen Klon CITEg16 (WO95/07357), der das vollständige ClFatB4-Gen aus *C. lanceolata* trägt, ein ca. 3,3 kb lange promotortragende Sall-BbvI Fragment isoliert. Hierzu wurde die BbvI-Schnittstelle am 3'-Ende des Promotors geöffnet und derart modifiziert, daß das Fragment anschließend in den mit Sall und SmaI geschnittenen pBluescript (Stratagene) aufgenommen werden konnte. Eine 1211 Nukleotide 5'-wärts liegende interne EcoRI-Schnittstelle des Fragments wurde deletiert, indem sie geöffnet, mittels T4 DNA-Polymerase modifiziert und anschließend wieder geschlossen wurde.

Die Terminatorsequenz wurde mittels der Polymerasekettenreaktion und spezifischen Oligonukleotidprimer an der CITEg16-Matrize (WO 95/07357) amplifiziert und über die Primer mit einer Reihe von Polylinkerschnittstellen (MCS) versehen. Die Sequenzen der Primer lauten:

5'GAATTCCTGCAGCCCCGGGGGATCCACTAGTCTCGAGAAGTGGCTGGGGGCC  
TTTCC3' (SEQ ID NO: 3)= 5'-primer: (MCS: EcoRI, PstI, SmaI, BamHI, SpeI XhoI;  
ClFatB4-Terminator: von Pos. 35 – 56) und

5'TCTAGAGGCCAAGGCGGCCGCTTCAACGGACTGCAGTGC3' (SEQ ID NO: 4)  
= 3'-primer: ClFatB4-Terminator: von Pos. 22 – 39, MCS: NotI, StyI, SfiI, XbaI. Das Amplifikat wurde mit EcoRI und NotI geschnitten und in die korrespondierenden Schnittstellen des pBlueSfi BA (Hausmann und Töpfer, s.o.) inseriert. Das promotortragende Fragment wurde mit BamHI geöffnet, modifiziert und anschließend mit Sall geschnitten, um es im pBlueSfi BA-Vektor über Sall und modifizierte HindIII-Schnittstelle vor den Terminator zu plazieren. Es resultierte die Expressionskassette pTE200 (s. Figur 7).

Zur Konstruktion eines Pflanzentransformationsvektors wurde ein 2270 bp langes EcoRI-Fragment der AATP1 cDNA aus *Solanum tuberosum* (pTM1, Tjaden et al. The Plant Journal 16 (1998) 531-540) in den mit EcoRI geöffneten Vektor pTE200 ligiert. Die Orientierung wurde mittels Restriktionsverdau überprüft. Es resultiert das Plasmid pTE208 (Figur 8). In einem anschließenden Schritt wurde das SfiI-

Fragment aus pTE208 in die Polylinkerschnittstellen des binären Vektors pMH000-0 (Figur 9) gerichtet inseriert. Es resultierte der Vektor pMH 0208.

Der binäre Plasmidvektor pMH000-0 ist eine Weiterentwicklung von pLH9000 (Hausmann und Töpfer, s.o.) mit alternativen Selektionsmarkern für die Pflanzentransformation. Hierzu wurde das Sulfonamidgen (sul) zusammen mit der Signalpeptidsequenz (tp) für plastidären Import der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase aus dem Vorläuferplasmid von pS001 (Reiss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, (1996), 3094-3098) nach Modifizierung der Asp718- zur XhoI-Schnittstelle isoliert. Das XhoI-SalI Fragment wurde in die XhoI- und BamHI-Schnittstellen eines pBluescript-Derivat vor den Terminator des Nopalinsynthasegens (pAnos) nach Modifizierung von SalI und BamHI eingeführt. In einer anschließenden Dreifragmentligation wurden das resultierende tpsul-pAnos Fragment (XhoI – XbaI) und das XhoI – HindIII Fragment aus pRT103pat (Töpfer et al., Methods in Enzymol. 217, (1993), 66-78) mit dem mit HindIII und XbaI geöffneten Plasmid pK18 (Pridmore, Gene 56, (1987), 309-312) vereint. Dabei kam das Gen für die Phosphinotricin Acetyltransferase mit dem Terminator des CaMV35S rna-Gens aus pRT103pat in entgegengesetzter Orientierung zur tpsul-pAnos-Einheit zu liegen. Zur Vervollständigung dieser doppelten Selektionseinheit (für Resistenz gegen das Herbizid Basta und das Sulfonamid Sulfadiazin) wurde ein dualer Promotor des CaMV35S rna-Gens als XhoI-Fragment aus einem Abkömmling von pROA93 (Ott et al., Mol. Gen. Genet. 221, (1990), 121-124) in die XhoI-Schnittstelle zwischen die Resistenz-vermittelnden Gensequenzen inseriert. Die resultierende duale Selektionskassette wurde über XbaI und HindIII gegen die Kanamycinkassette im pLH9000-Vorläuferplasmid (Hausmann und Töpfer, s.o.) nach entsprechenden Modifikationen im angrenzenden Polylinker ausgetauscht. Daraus resultierte der binäre Plasmidvektor pMH000-0.

Die Transformation von Hypokotylexplantaten von Raps der Sorte Drakkar erfolgte nach dem Protokoll von De Block (Plant Physiol. 91 (1989), 694-701) mit Hilfe von Agrobakterien (Stamm GV 3101 C58C1 Rif<sup>r</sup>), die den binären Vektor pMH0208 (ATP/ADP Transporter sense) trugen. Sprosse wurden auf selektivem Nährmedium (Sulfonamid) regeneriert und im Gewächshaus bis zur Samenreife kultiviert. Mittels

PCR und Blatttest (Toleranz gegenüber Glufosinatummonium (Basta®)) wurde überprüft, welche Pflanzen das Transgen enthielten. Von diesen Pflanzen wurden heranreifende Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Bestimmung des Ölgehalts wurde reifes Saatgut von transgenen Rapslinien und von Kontrolllinien mit Hilfe der nicht-invasiven Nahinfrarotspektroskopie (beispielsweise beschrieben bei Schulz et al., J. Near Infrared Spectrosc. 6, (1998), A125-A130; Starr et al., J. Agric. Sci. 104(2), (1985), 317-323) untersucht.

**Patentansprüche**

1. Transgene Pflanzenzelle, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht, dessen Vorhandensein oder dessen Expression zur Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen aus Wildtyp-Pflanzen.
2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül einen plastidären ADP/ATP-Translokator codiert.
3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei das Nucleinsäuremolekül einen plastidären ADP/ATP-Translokator aus *Arabidopsis thaliana* codiert.
4. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die einen erhöhten Ertrag im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen aufweist.
5. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, die einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen aufweist.
6. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die eine Stärke synthetisiert, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen einen erhöhten Amylosegehalt aufweist.
7. Transgene Pflanze enthaltend transgene Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Transgene Pflanze nach Anspruch 7, die eine öl- und/oder stärkepeichernde Pflanze ist.

9. Transgene Pflanze nach Anspruch 8, die eine Mais-, Raps-, Weizen- oder Kartoffelpflanze ist.
10. Verfahren zu Herstellung einer transgenen Pflanze, die im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Ertrag aufweist, wobei
  - (a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, dessen Vorhandensein oder dessen Expression zur Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität in der Zelle führt;
  - (b) aus der gemäß Schritt (a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und
  - (c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die transgene Pflanze im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt aufweist, und/oder deren Stärke einen erhöhten Amylosegehalt im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen aufweist.
12. Transgene Pflanze erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 10 oder 11.
13. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7 bis 9 oder 12, wobei dieses Vermehrungsmaterial transgene Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.
14. Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen, die im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Ertrag aufweist.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die transgene Pflanze einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt aufweisen und/oder die eine Stärke synthetisieren,



die im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Amylosegehalt aufweist.

16. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend die Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 7 bis 9 oder nach Anspruch 12.

THIS PAGE BLANK (b)

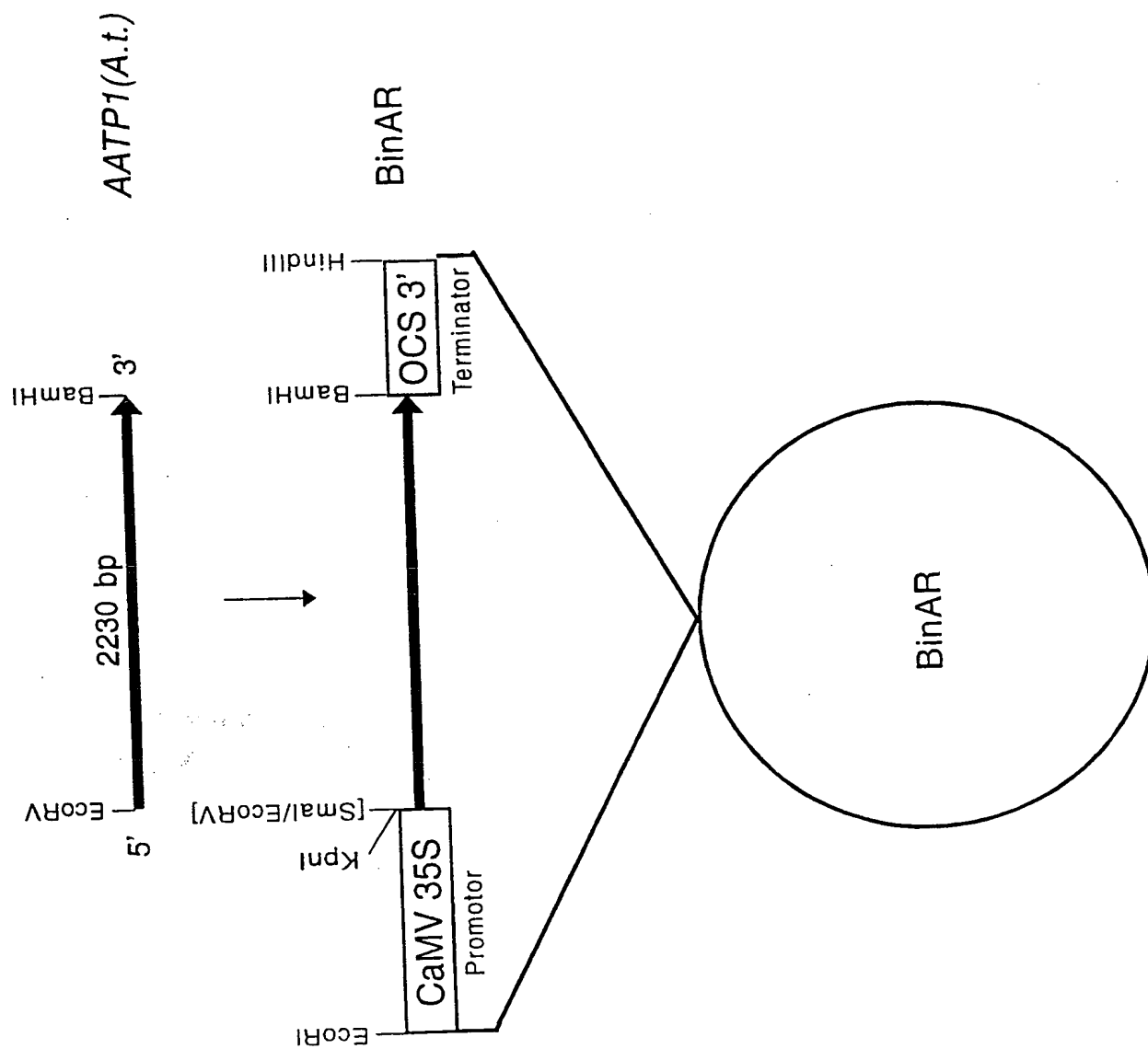
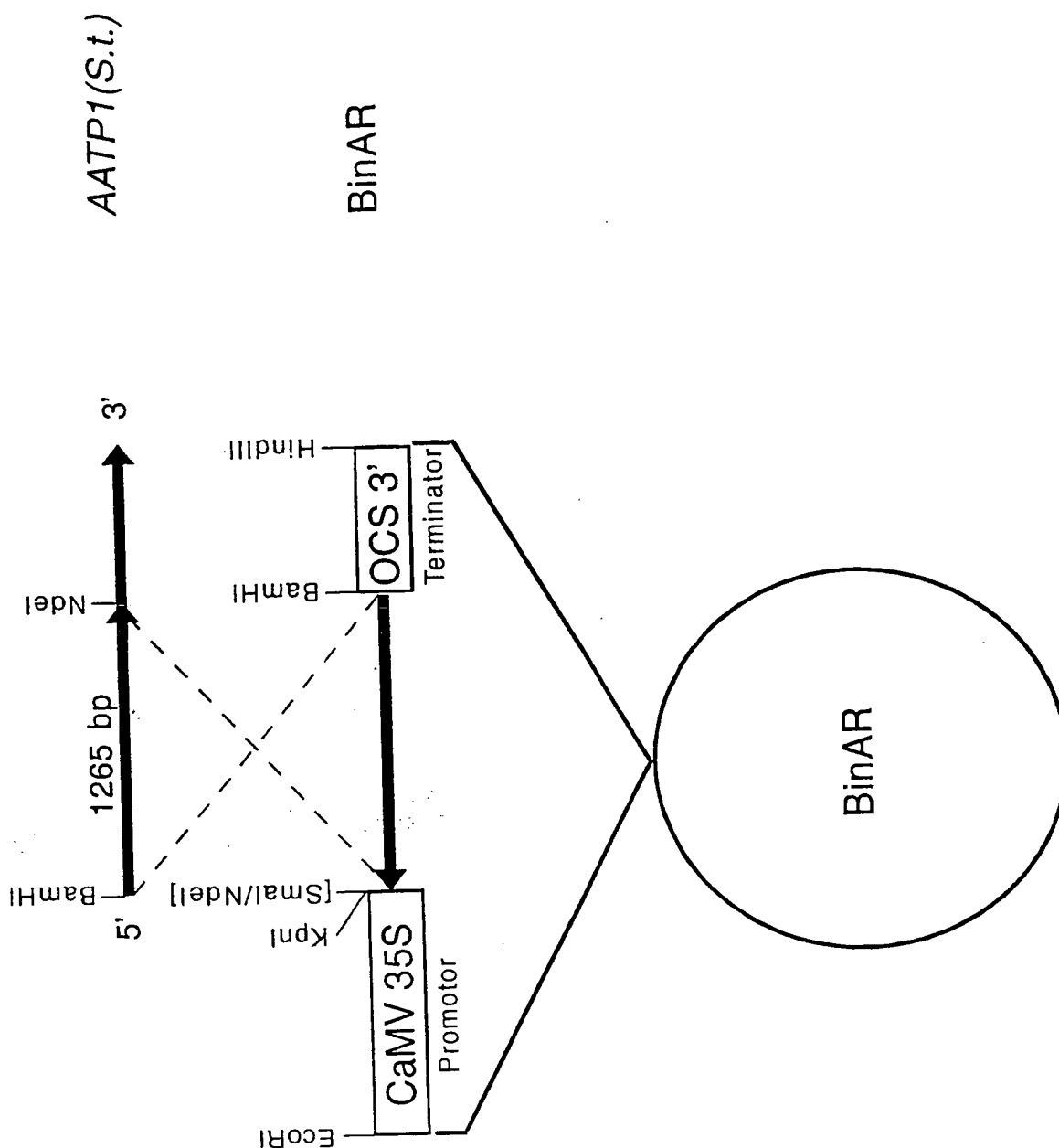


Fig. 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**Fig. 2**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

DC Alignment:

3/8

- 1 AATP1\_A.T.\_  
2 AATP2\_A.t.\_  
3 TLC\_

```

      10      20      30      40      50      60
1 MEAVIQTRGLLSLPTKPIGVRSQ LQPSHGLKQRLFAAKPRNLHGCLYPLTGTRNFKPLSQ 60
2 MEGLIQTRGILSLPASHR-SEKVLQPSHGLKQRLFTTN---LPALSLSLMVTRNFKPFSK 56
3 -----MS-----TSK-----SENY--LS- 11

      70      80      90     100     110     120
1 PCMGFRFPTKREAPSSYARRRG CWRRSCLRRSDSAAVVASRKIFGVEVATLKKIPLGL 120
2 SHLGFRFPTRREAEDSLARRKLRPRRKCVDEGDTAAMAVSPKIFGVEVTTLKKIVPLGL 116
3 -----EL-----RKIWP-----IEQYENKKFLPLAF 33

     130     140     150     160     170     180
1 MFFCILFN YITLRDTKDV LVVTAKGSSAEIIPFLKTWVNLPMAIGFMLLYTKLSNVLSKK 180
2 MFFCILFN YITLRDTKDV LVVTAKGSSAEIIPFLKTWVNLPMAIGFMLLYTKLSNVLSKK 176
3 MMFCILLN YSTLRSIKDGFV VTDIG-T-ESISFLKTYIVLPSAVIAMIIYVKLCDILKQE 91

     190     200     210     220     230     240
1 ALFYTVIVPFIIFYGGFGFVMYPLSNYIHPEALADKLLTTLGPRFMGPAILRIWSFCLF 240
2 ALFYTVIVPFIIFYFGAFGVMPYPRSNLIQPEALADKLLATLGPRFMGPLAIMRIWSFCLF 236
3 NVFYVITSFFLGYFALFAFVLYPPYDLVHPDHKTIESLSLAYPNFKWFIKIVGKWSFASF 151

     250     260     270     280     290     300
1 YVMAELWGSVVVSVLFWGFANQITTVDEAKKFYPLFGIGANVALIFSGRTVKYFSNLRKN 300
2 YVMAELWGSVVVSVLFWGFANQITTVDEAKKFYPLFGLGANVALIFSGRTVKYFSNMRKN 296
3 YTIAELWGTMMMLSLFWQFANQITKIAEAKRFYSMFGLLANLALPVTSVVIGYFLHEKTQ 211

     310     320     330     340     350     360
1 LGPGVDGSFV--ESHDEHCGNGTRICLSIGGSNRYV---P-L--PTRSKNKKEKPKMGT 352
2 LGPGVDGWAVSLKAMMSIVVGMGLAICFLYWWVNRYV---P-L--PTRSKKKKVKPQMGT 350
3 I-VAEHLKFV---PLFVIMITSSFLIILTYRWMNKNVLTDPRLYDPALVKEKKTAKLSF 267

     370     380     390     400     410     420
1 MESLKFLVSSPYIRDLATLVVAYGISINLVEVTWKSCLKAQFPSPNEYSAFMGAFSTCTG 412
2 MESLKFLVSSPYIRDLATLVVAYGISINLVEVTWKSCLKSQFPSPNEYSAFMGDFSTCTG 410
3 IESLKMIFTSKYVGYIALLIIAYGVSVN LVEGVWKS VKELYPTKEAYTIYMGQFQFYQG 327

     430     440     450     460     470     480
1 VATFTMMLLSQYVFNKYGWGVAAKITPTVLLLTGVAFFSLILFGGPFA-PLVAKLGMTPL 471
2 IATFTMMLLSQYVFKKYGWGVAAKITPTVLLLTGVAFFSLILFGGPFA-PLVAKLGMTPL 469
3 WVAIAFMLIGSNILRKVSWLTAAMITPLMMFITGAFFSFIFFDSVIAMNLTGILASSPL 387

     490     500     510     520     530     540
1 LAAVYVGALQNIFSK-SAKYSLFDPCKEMAYIPLDEDTKVKGKAIDVVCNPLGKSGGAL 530
2 LAAVYVVPPEVSSARVQVQHSSTPSAMQECLYPLDEVSKVKAKLQL-MWSATIGKSGGAL 528
3 TLAVMIGMIQNVLSK-GVKYSLFDATKNMAYIPLDKDLRVKGQA AVEVIGGRLGKSGGAI 446

     550     560     570     580     590     600
1 IQQ-FMIL--SFGSLANSTPYLGMILLVIVTAWLAAAKSLEGQFNSLRLKKS LRRKWREL 587
2 IQQ-FMIL--TFGSLANSTPYLG VILLGIVTAWLAAAKSLEGPV----- 569
3 IQSTFFILFPVFGFI-EATPYFASIFFIIVILWIFAVKGLNKEYQVL-VNKNEK----- 498

1 HR 589
2 -- 569
3 -- 498

```

Fig. 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



4/8

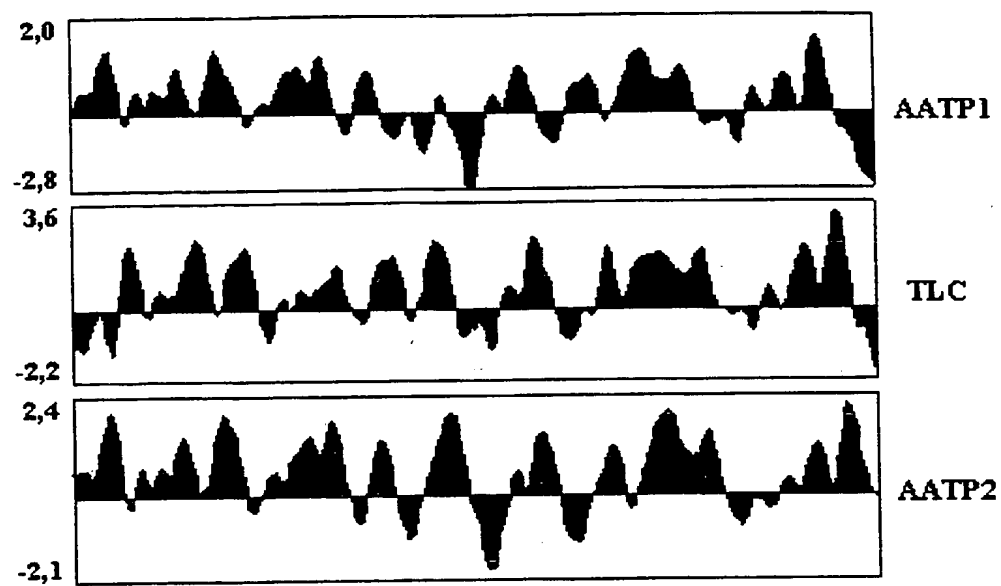


Fig. 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5/8

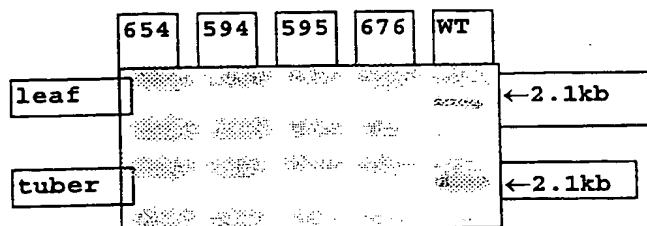


Fig. 5

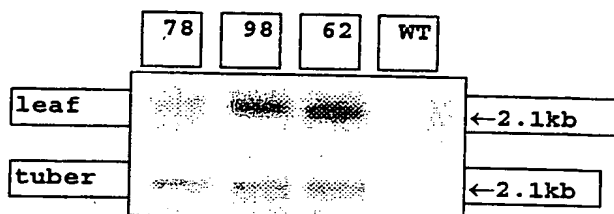


Fig. 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

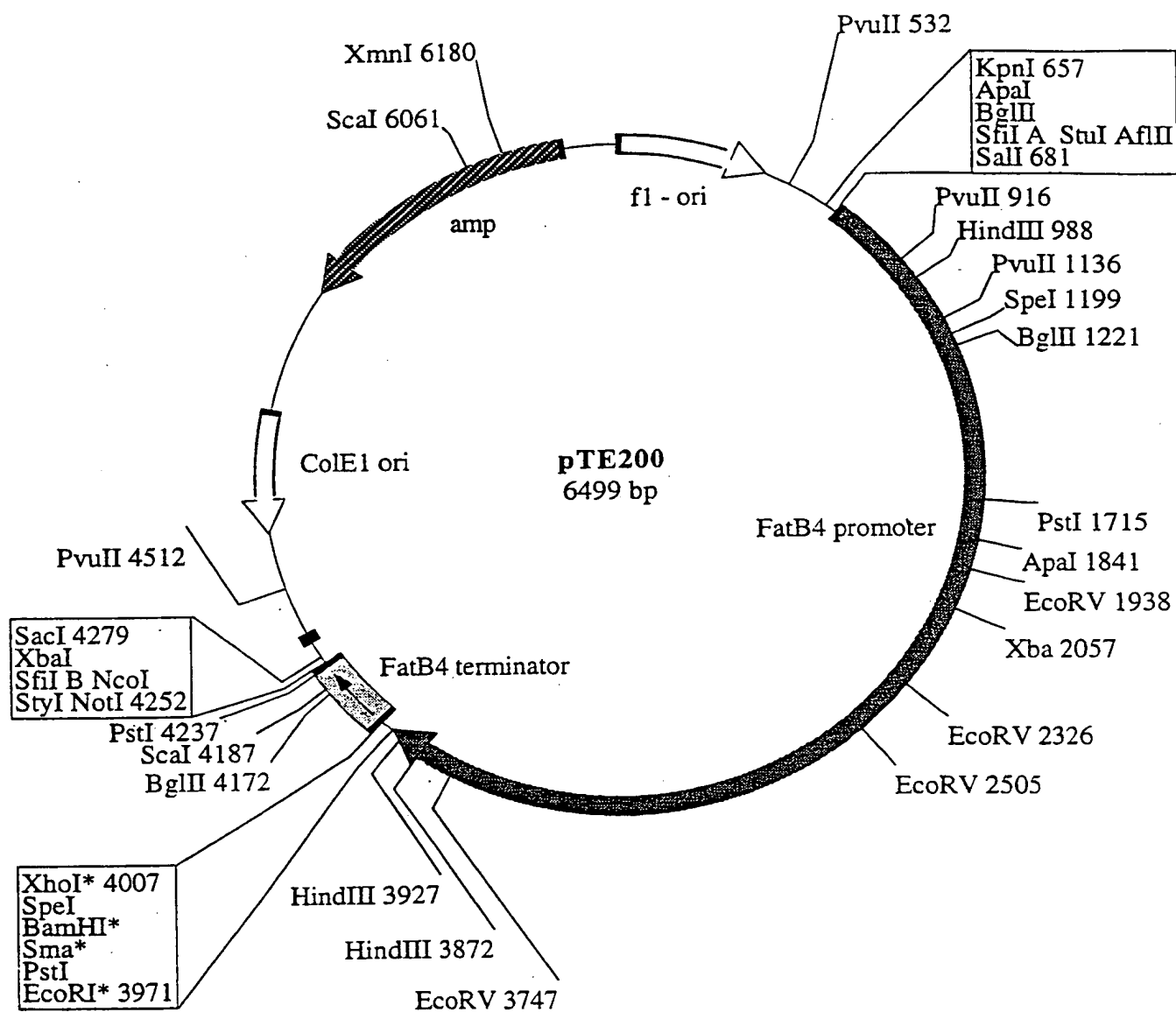


Fig. 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/8

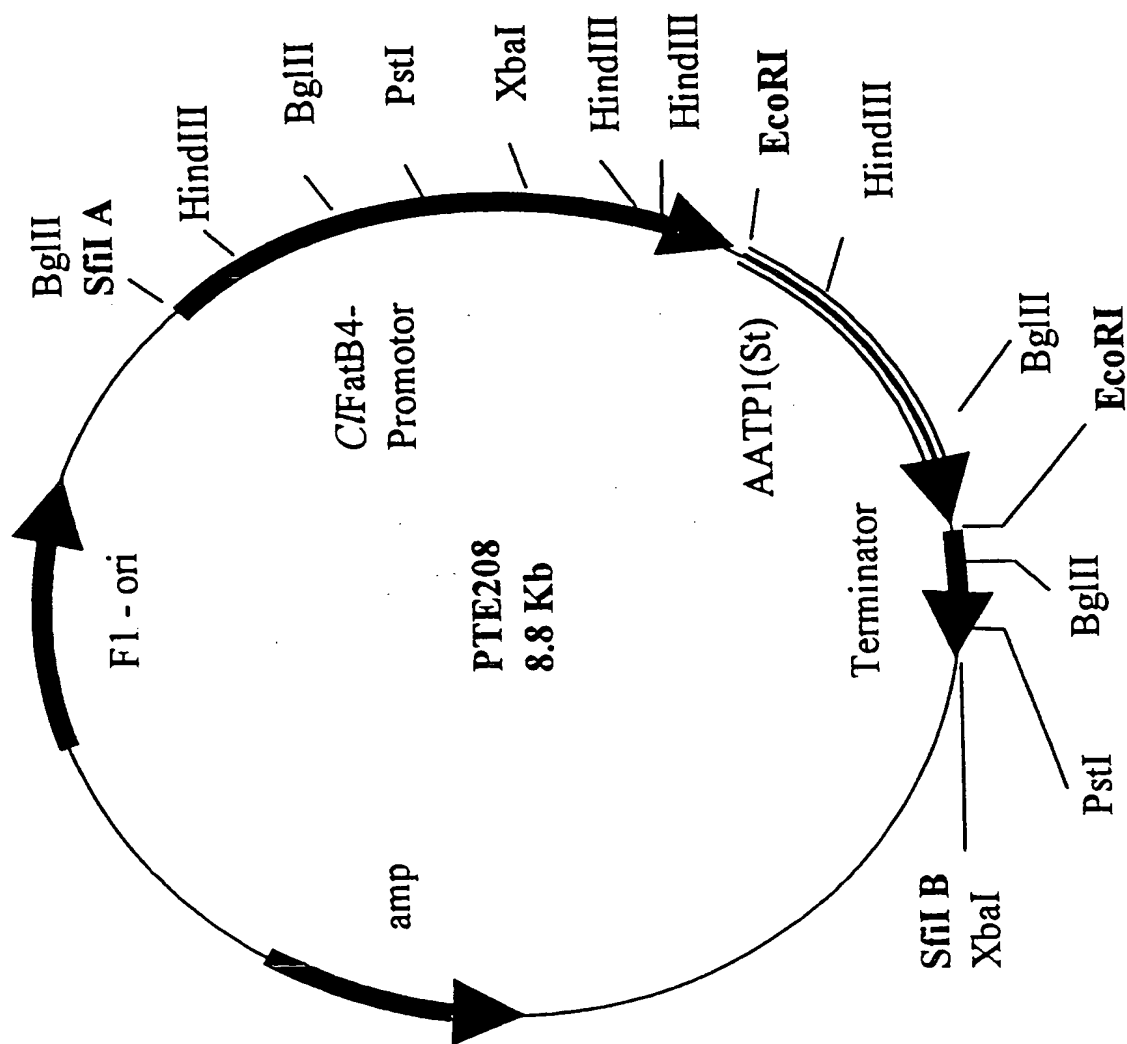


Fig. 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



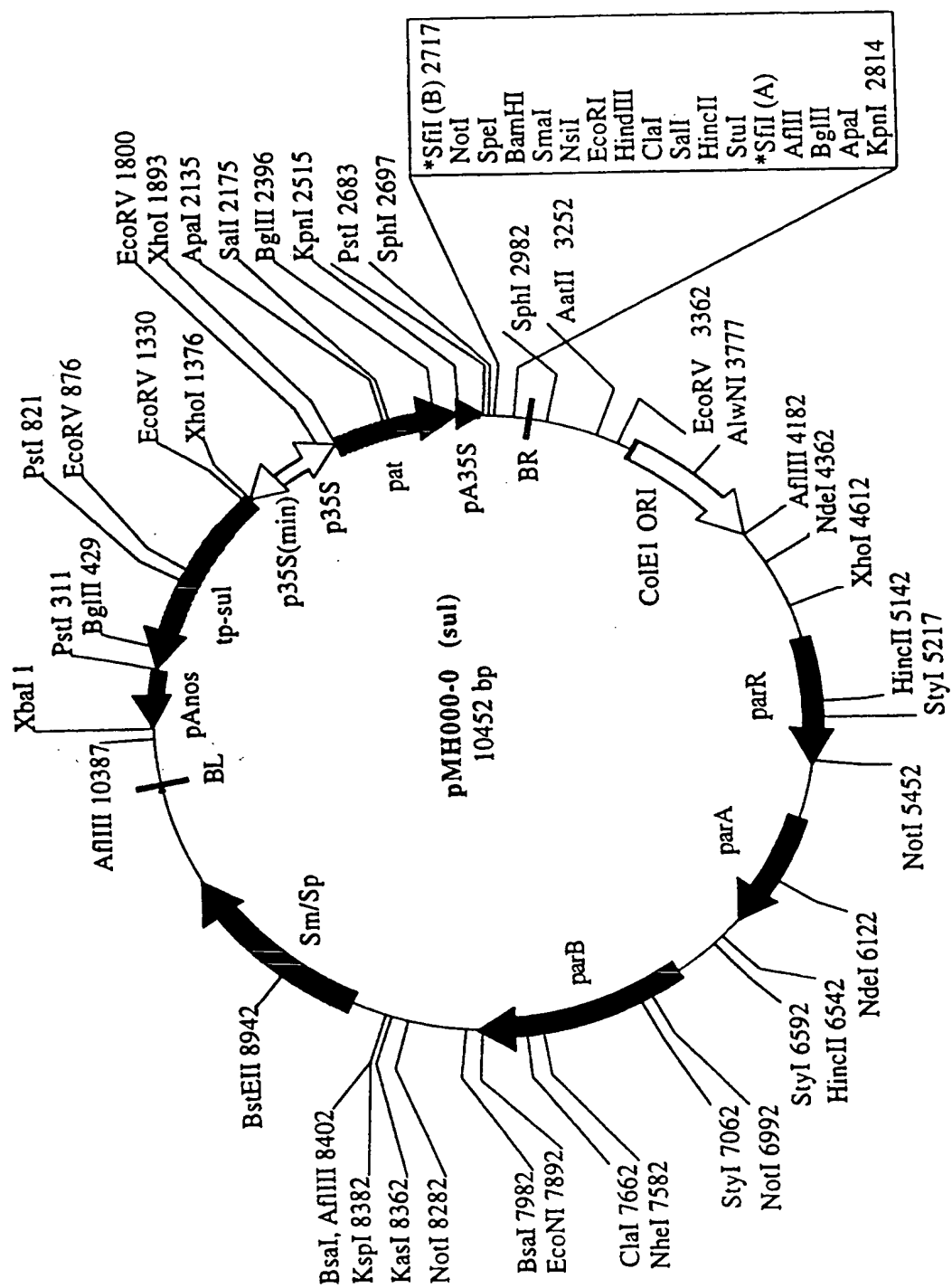


Fig. 9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/3

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: PlantTec Biotechnologie GmbH Forschung & Entwicklung
- (B) STRASSE: Hermannswerder 14
- (C) ORT: Potsdam
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 14473

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften  
e. V.
- (B) STRASSE: keine
- (C) ORT: Berlin
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: keine

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Transgene Pflanzen mit veränderter Aktivität eines plastidären ADP/ATP-Translokators

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure "

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGTGAGAGAT AGAGAGCTCG AGGGTCTGAT TCAAACC

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/3

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GATACAACAG GAATCCTGGA TGAAGC

26

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure "

## (iii) HYPOTHETISCH: JA

## (iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCCTGC AGCCCGGGGG ATCCACTAGT CTCGAGAAGT GGCTGGGGGC CTTTCC

56

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TCTAGAGGCC AAGGCGGCCG CTTCAACGGA CTGCAGTGC

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference C 1540 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/03292	International filing date (day/month/year) 12 May 1999 (12.05.99)	Priority date (day/month/year) 13 May 1998 (13.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/		
Applicant PLANTTEC BIOTECHNOLOGIE GMBH FORSCHUNG & ENTWICKLUNG		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 26 November 1999 (26.11.99)	Date of completion of this report 21 August 2000 (21.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/03292

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages 1-44, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 1-16, filed with the letter of 27 July 2000 (27.07.2000),  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig 1/8-8/8, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03292

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	6, 11, 16	YES
	Claims	1 - 5, 7 - 10, 12 - 15	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: NEUHAUS H.E. ET AL.: PLANT JOURNAL, Vol. 11,  
No. 1, 1997, pages 73 to 82

D2: Möhlmann et al.: Eur. J. Biochem. 252, 353 - 359  
(1998).

Re the letter of 27 July 2000.

#### 1. Novelty (PCT Article 33(2))

1.1 The newly submitted claims concern genetically modified transgenic plant cells which have increased ADP/ATP translocator activity in comparison with wild type cells and plants.

1.2 Perfected transgenic plant cells of this type are not known from the prior art.

1.3 Consequently the subject matter of Claims 1 to 16 is novel and the requirements of PCT Article 33(2) are met.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2. Inventive step (PCT Article 33(3))

- 2.1 For the following reasons, the applicant's comments submitted with the amended claims only partially give cause to deviate from the earlier opinion:

D1 is considered the closest prior art.

That document describes the characterization of a new eucaryotic ATP/ADP translocator (AATP1) from the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana*. The cDNA that codes for this AATP1 protein was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*.

Following reconstitution of the extracted protein, increased ATP transport could be observed in both expression systems (see abstract).

D1 also refers to the fact that the cloning of AATP1, in conjunction with the possibility of producing transgenic plants in which the expression of this translocator is either regulated upwards or downwards, provides a basis for understanding whether it is possible to influence the starch or fatty acid content or the starch to fatty acid ratio in the storage organs of higher plants by increasing or decreasing the ATP import rate in plastids (see page 79).

D1 further refers to the fact that the activity of the plastidial ATP/ADP translocator is limiting for the synthesis rate of starch and fatty acids in amyloplasts of sprouts.

Thus D1 discloses the problem of interest - producing plants having a higher yield - and also describes the solution - genetic modification by introducing into the plant cells a nucleic acid

THIS PAGE BLANK (USPTO)



molecule that codes for an ADP/ATP translocator.

- 2.2 D2 is a further document which is concerned with ATP/ADP transporters in *Arabidopsis thaliana*. That document investigates a molecular characterization and comparative structural analysis of two similar ATP/ADP translocators from the plastids of *Arabidopsis thaliana* and *Rickettsia prowazekii*. Page 354 of D2 describes that the main task of the plastidial ATP/ADP transport is to prepare cytosolic ATP for the stroma in order to ensure important anabolic reactions. Starch and fatty acid synthesis are given as examples, two processes which, in heterotrophic plants, are closely associated with the presence of exogenic ATP. Thus D2 also provides clear reasons for using already known genes that are essential for the starch and fatty acid balance for the purposes proposed by the present application.

It is clear from the above descriptions of the documents that it is certainly realistic to assume, with reasonable expectation of success, that the expression of those genes would influence the starch content.

In this respect, it is not possible to concur with the statement on page 9 of the application that it would be completely unexpected for an increase in the activity of the plastidial ADP/ATP translocator to increase the starch content in corresponding plants since at least two documents (D1, D2) already explicitly mention such an effect.

However, it is correct that neither of the two citations explicitly mentions the amylose content or

**THIS PAGE BLANK (USPTO**

composition of starch. The fact that starch is composed of amylose and amylopectin will be neither novel nor unexpected for a person skilled in the art of biology or biochemistry. However, the examining authority agrees with the applicant's argument that it was unexpected that the molecular properties of starch are determined by the expression of those enzymes.

2.3 Consequently Claims 1 to 4, which concern the increase in plastidial ADP/ATP translocator activity, are not inventive.

Furthermore no inventive step is recognized in the subject matter of Claims 5, 7 to 10 and 12 to 15 since D1 in particular, and also D2, addresses the same problem and proposes the same solution for increasing the yield of starch in transgenic plant seeds.

Claims 6, 11 and 16, on the other hand, appear to meet the requirements of PCT Article 33(3).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

3. Clarity (PCT Article 6)

3.1 Claim 1 - which claims the increase in plastidial ADP/ATP translocator activity - does not meet the requirements of PCT Article 6.

The technical feature "foreign nucleic acid molecule ... whose expression increases plastidial ADP/ATP translocator activity" is vague and unclear, since it does not clearly define the scope of protection. The description indicates that the following feature is essential for defining the invention:

"codes for a plastidial ADP/ATP translocator".

Since independent Claim 1 does not contain this feature, it does not meet the requirement of PCT Article 6 in conjunction with PCT Rule 6.3(b), that each independent claim shall contain all the technical features necessary for defining the invention.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 24 AUG 2000

WIPO

PCT



### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>C 1540 PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP99/03292</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>12/05/1999</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>13/05/1998</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>C12N15/00</b>		
Anmelder <b>PLANITEC BIOTECHN..GMBH FORSCHUNG u.ENTWICKLUNG</b>		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
  - ☒ Grundlage des Berichts
  - ☐ Priorität
  - ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
  - ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
  - ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
  - ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
  - ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
  - ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  <b>26/11/1999</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  <b>21.08.00</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Novak, S</b>  Tel. Nr. +49 89 2399 8930  

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03292

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-44 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-16 eingegangen am 27/07/2000 mit Schreiben vom 27/07/2000

### Zeichnungen, Blätter:

1/8-8/8 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1 - 16
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 6, 11, 16
	Nein: Ansprüche 1 - 5, 7 - 10, 12 - 15
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1 - 16
	Nein: Ansprüche

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPIC**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: NEUHAUS H E ET AL.: PLANT JOURNAL, Bd. 11, Nr. 1, 1997, Seiten 73-82

D2: Möhlmann et al.; Eur. J. Biochem. 252, 353 - 359 (1998)

Auf den Brief vom 27. Juli 2000.

ad V.

1. Neuheit (Artikel 33(2) PCT)

- 1.1. Die neu eingereichten Ansprüche beziehen sich auf genetisch modifizierte, transgene Pflanzenzellen, die im Vergleich zu Wildtypzellen bzw. -pflanzen eine erhöhte ADP/ATP-Translokatoraktivität aufweisen.
- 1.2. Derartig ausgearbeitete, transgene Pflanzenzellen sind vom Stand der Technik nicht bekannt.
- 1.3. Daraus folgt, daß der Gegenstand von Ansprüchen 1 - 16 neu ist, und die Erfordernisse von Artikel 33(2) PCT erfüllt.

2. Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT)

- 2.1. Die mit den geänderten Ansprüchen eingereichte Stellungnahme des Anmelders gibt aus den im folgenden dargelegten Gründen nur teilweisen Anlaß, von der bereits mitgeteilten Auffassung abzugehen:

D1 wird als nächster Stand der Technik erachtet.

Dieses Dokument beschreibt die Charakterisierung eines neuen eukaryontischen ATP/ADP Translokators (AATP1) aus der Plastidhülle von *Arabidopsis thaliana*. Die cDNA, die dieses AATP1 Protein kodiert, wurde in *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* exprimiert. In beiden Expressionssystemen konnte nach Rekonstitution des extrahierten Proteins erhöhter ATP Transport beobachtet werden (siehe Abstrakt).

D1 nimmt auch Bezug darauf, daß die Klonierung von AATP1, in Zusammenhang

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

mit der Möglichkeit transgene Pflanzen zu erzeugen, in denen die Expression dieses Translokators entweder hinauf- oder herab geregelt ist, eine Grundlage bietet zu verstehen, ob es möglich ist, den Stärke- bzw. Fettsäuregehalt oder das Verhältnis von Stärke und Fettsäuren in Speicherorganen höherer Pflanzen über die Anhebung bzw. Verminderung der Rate des ATP Imports in Plastiden zu beeinflussen (siehe Seite 79).

Weiters verweist D1 darauf, daß die Aktivität des plastidären ATP/ADP Translokators limitierend für die Syntheserate von Stärke und Fettsäuren in Amyloplasten von Kohlsprossen sei.

Somit ist aus D1 das zu lösende Problem - Pflanzen mit erhöhtem Ertrag zur Verfügung zu stellen - bekannt, und auch die Lösung - genetische Modifikation, durch Einführung eines Nukleinsäuremoleküls in die Pflanzenzellen, welches einen ADP/ATP Translokator kodiert - beschrieben.

- 2.2. D2 ist ein weiteres Dokument welches sich mit ATP/ADP Transportern in *Arabidopsis thaliana* beschäftigt. In diesem Dokument wird eine molekulare Charakterisierung und vergleichende Strukturanalyse zweier ähnlicher ATP/ADP Translokatoren aus den Plastiden von *Arabidopsis thaliana* bzw. von *Rickettsia prowazekii* untersucht.

Auf Seite 354 von D2 wird beschrieben, daß die Hauptaufgabe des plastidären ATP/ADP Transportes darin besteht cytosolisches ATP für das Stroma bereitzustellen, um wichtige anabole Reaktionen zu gewährleisten. Als Beispiel werden Stärke- und Fettsäuresynthese angeführt, zwei Prozesse die in heterotrophen Pflanzen strikt an das Vorhandensein von exogenen ATP gebunden sind.

Damit wird auch in D2 die klare Motivation gegeben, bereits bekannte, für den Stärke- und Fettsäurehaushalt essentielle, Gene für die von der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagenen Zwecke zu verwenden.

Durch die oben angeführten Beschreibungen der Dokumente wird deutlich, daß es durchaus realistisch ist, und mit einer angemessenen Erwartung auf Erfolg davon ausgegangen werden kann, daß die Expression jener Gene zu einer Beeinflussung des Stärkegehaltes führen wird.

Insofern kann der Feststellung auf Seite 9 der Anmeldung - es wäre völlig

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



überraschend daß eine Steigerung der Aktivität des plastidären ADP/ATP-Translokators zu einer Erhöhung des Stärkegehalts in entsprechenden Pflanzen führe - nicht zugestimmt werden, da mindestens 2 Dokumente (D1, D2) eine solche Auswirkung bereits explizit erwähnen.

Es ist jedoch richtig, daß in keinem der beiden zitierten Dokumente der Amylosegehalt, oder die Zusammensetzung von Stärke explizit erwähnt wird. Die Tatsache, daß Stärke aus Amylose und Amylopektin aufgebaut ist, wird dem biologisch/biochemisch ausgebildeten Fachmann, weder neu noch überraschend erscheinen. Jedoch kann dem Argument des Antragstellers zugestimmt werden, das nicht zu erwarten war, daß die molekularen Eigenschaften von Stärke durch die Expression jener Enzyme bestimmt werden.

- 2.3. Es folgt, dass Ansprüche 1 - 4, die sich mit der Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität befassen, nicht erfinderisch sind. Weiters wird kein erfinderischer Schritt für den Gegenstand von Ansprüchen 5, 7 - 10, und 12 - 15 anerkannt, da insbesondere D1, aber auch D2 dasselbe Problem, bzw. dieselbe Lösung für die Ertragssteigerung von Stärke in transgenen Pflanzensamen vorschlagen. Ansprüche 6, 11, und 16 hingegen erscheinen die Erfordernisse von Artikel 33(3) PCT zu erfüllen.

ad VIII.

### 3. Klarheit (Artikel 6 PCT)

- 3.1. Der Anspruch 1 - der die Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität beansprucht - entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT. Das technische Merkmal "fremdes Nukleinsäuremolekül..dessen Expression zur Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität führt.." ist vage und unklar, da es den Umfang des Schutzbereiches nicht klar definiert. Aus der Beschreibung geht hervor, daß das folgende Merkmal für die Definition der Erfindung wesentlich ist:

"..einen plastidären ADP/ATP-Translokator kodiert.."

**THIS PAGE BLANK (USE FOR**

Da der unabhängige Anspruch 1 dieses Merkmal nicht enthält, entspricht er nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, daß jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.

**THIS PAGE BLANK (USP 10)**

27. Juli 2000

Patentansprüche

1. Transgene Pflanzenzelle, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht, dessen Vorhandensein oder dessen Expression zur Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen aus Wildtyp-Pflanzen.
2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül einen plastidären ADP/ATP-Translokator codiert.
3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei das Nucleinsäuremolekül — einen plastidären ADP/ATP-Translokator aus *Arabidopsis thaliana* codiert.
4. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die einen erhöhten Ertrag im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen aufweist.
5. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, die einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen aufweist.
6. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die eine Stärke synthetisiert, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen einen erhöhten Amylosegehalt aufweist.
7. Transgene Pflanze enthaltend transgene Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Transgene Pflanze nach Anspruch 7, die eine öl- und/oder stärkepeichernde Pflanze ist.
9. Transgene Pflanze nach Anspruch 8, die eine Mais-, Raps-, Weizen- oder Kartoffelpflanze ist.

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

10. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, die im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Ertrag aufweist, wobei
  - (a) eine pflanzliche Zelle genetisch modifiziert wird durch die Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, dessen Vorhandensein oder dessen Expression zur Erhöhung der plastidären ADP/ATP-Translokatoraktivität in der Zelle führt;
  - (b) aus der gemäß Schritt (a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und
  - (c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze gegebenenfalls weitere Pflanzen erzeugt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die transgene Pflanze im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt aufweist, und/oder deren Stärke einen erhöhten Amylosegehalt im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen aufweist.
12. Transgene Pflanze erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 10 oder 11.
13. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7 bis 9 oder 12, wobei dieses Vermehrungsmaterial transgene Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.
14. Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, die einen plastidären ADP/ATP-Translokator codieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen, die im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Ertrag aufweisen.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die transgene Pflanze einen erhöhten Öl- und/oder Stärkegehalt aufweisen und/oder die eine Stärke synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Amylosegehalt aufweist.
16. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend die Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 7 bis 9 oder nach Anspruch 12.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>C1540PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/ 03292</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>12/05/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>13/05/1998</b>
Anmelder  <b>PLANTTEC BIOTECHN..GMBH FORSCHUNG u.ENTWICKLUNG</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**THIS PAGE BLANK (OSP 10)**

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C07K14/415 A01H5/00 C12N15/29

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NEUHAUS H E ET AL.: "Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of Arabidopsis thaliana L." PLANT JOURNAL, Bd. 11, Nr. 1, 1997, Seiten 73-82, XP002126932 ISSN: 0960-7412 in der Anmeldung erwähnt siehe besonders Seite 7 Absatz 2 das ganze Dokument	1-16
A	WO 94 10320 A (MOGEN INT ; SIJMONS PETER CHRISTIAAN (NL); GODDIJN OSCAR JOHANNES M) 11. Mai 1994 (1994-05-11) das ganze Dokument	

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Januar 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MÖHLMANN T ET AL.: "Occurrence of two plastidic ATP/ADP transporters in Arabidopsis thaliana L" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 252, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 353-359, XP000865628 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument ---	
A	EMMERMANN M ET AL.: "The ADP/ATP translocator from potato has a long amino-terminal extension" CURRENT BIOLOGY, Bd. 20, Nr. 5, November 1991 (1991-11), Seiten 405-410, XP000863257 das ganze Dokument -----	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

### Information on patent family members

PCT/EP 99/03292

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

THIS PAGE BLANK (CONT.)